

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК
ГРНТИ
Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный университет им. А.М. Горького»
От имени Руководителя организации _____/А.О. Иванов/ М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 3 этапа Государственного контракта
№ П1370 от 02 сентября 2009 г. и Дополнению от 29 октября 2009 г. № 1/П1370,
Дополнению от 05 апреля 2010 г. № 2/П1370, Дополнению от 28 июля 2010 г. № 3,
Дополнению от 05 марта 2011 г. № 4

Исполнитель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный университет им. А.М. Горького»
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.
Проект: Влияние трифторметилированных производных пирана и их циклоаддуктов на развитие растений и процессы метаболизма
Руководитель проекта: _____/Усачев Борис Иванович (подпись)

Екатеринбург
2011 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту П1370 от 02 сентября 2009 на выполнение поисковых
научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный университет им. А.М. Горького»

Руководитель темы:

доктор химических наук, доцент	_____ Усачёв Б. И.
	подпись, дата

Исполнители темы:

без ученой степени, без ученого звания	_____ Обыденнов Д. Л.
	подпись, дата

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник	_____ Федосеева Г. П.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Усачёв С. А.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Чепракова Е. А.
	подпись, дата

без ученой степени, без ученого звания	_____ Денисова А. В.
	подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 107 с., 1 ч, 94 источника, 59 рис., 4 табл., 14 схем, 3 прил.

ТРИФТОРМЕТИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРАНА, МЕТАБОЛИЗМ, ЭТИЛ 6-(ТРИФТОРМЕТИЛ)КОМАНОАТ, 6-(ТРИФТОРМЕТИЛ)КОМАНОВАЯ КИСЛОТА, ТРИФТОРМЕТИЛИРОВАННЫЕ ИНДОЛЫ, ТРИФТОРМЕТИЛИРОВАННЫЕ ПИРАЗОЛО[1,5-*c*]ПИРИМИДИНЫ.

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 3 этапу Государственного контракта № П1370 "Влияние трифторметилированных производных пирана и их циклоаддуктов на развитие растений и процессы метаболизма" (шифр "НК-192П") от 02 сентября 2009 по направлению "Физико-химическая молекулярная и клеточная биология" в рамках мероприятия 1.3.1 "Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.", мероприятия 1.3 "Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук и целевыми аспирантами в научно-образовательных центрах", направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Объектом исследования являются трифторметилированные производные пирана и их производные.

Цель работы — исследование метаболизма трифторметилированных производных пирана и их влияния на развитие растений.

Показано, что производные 2-трифторметил-4*H*-пиран-4-она могут претерпевать метаболизм в тканях растений либо по пути восстановления двойных связей ($C=C$ связи при CF_3 группе и $C=O$ связи), либо по пути гидролиза бокового заместителя при атоме $C-2$ пиренового кольца.

Обнаружено, что различные виды растений по-разному участвуют в метаболизме трифторметилированных производных пирана. При использовании в качестве ксенобиотика 6-(трифторметил)команоата (ЭТК) показано, что этот трифторметилированный пирон под действием тканей моркови быстро претерпевает гидролиз до 6-(трифторметил)комановой кислоты, тогда как под действием тканей капусты белокочанной он подвергается селективному восстановлению до этил *цис*-4-гидрокси-6-(трифторметил)-5,6-дигидро-4*H*-пиран-2-карбоксилата, который является трифторметилированным аналогом циклического ядра биологически активных кислот и гликозидов. Найдено, что ЭТК индуцирует образование в тканях картофеля 3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазина, что, по-видимому, связано с участием в процессах

дезактивации трифторметилированных метаболитов молекул белковой природы, которые разрушаются с экструзией аминокислот. На основе 6-(трифторметил)комановой кислоты и ее производных синтезирован целый ряд трифторметилированных производных непиранового ряда: трифторметилированных 3-(пиразолил)индолов и пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов, которые представляют большой интерес как с точки зрения использования их в качестве трифторметилированных ксенобиотиков индольного и пиразолопиримидинового рядов, так и с точки зрения применения в медицинской химии для создания новых потенциальных лекарств, обладающих антидиабетической активностью и свойствами ингибиторов PDK–киназы. Исследован метаболизм ЭТК в интактных растениях злаков и показано, что при попадании в корневую систему, он сразу же подвергается гидролизу под действием растительных эстераз до 6-(трифторметил)комановой кислоты, которая распределяется как по корневой системе, так и по тканям листьев, не оказывая какого-либо выраженного негативного влияния на развитие растений.

СОДЕРЖАНИЕ

Нормативные ссылки	7
Определения	8
Обозначения и сокращения	9
Введение	10
1. Основная часть	11
1.1. Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I этапе	11
1.2. Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на II этапе	14
1.3. Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований	17
1.3.1. Аналитический обзор по биосинтезу алкалоидов	17
1.3.2. Выбор и обоснование оптимального варианта направления исследований в области анализа метаболизма и структурных изменений в клетках и тканях растений под действием трифторметилированных производных пирана	18
1.3.2.1. Исследование структурных изменений в клетках и тканях растений возникающих под ксенобиотическим воздействием. Влияние ксенобиотического воздействия на специализированные структуры накопления вторичных метаболитов, и на внешнюю секрецию растений	19
1.3.2.1.1. Определение возможных метаболитов при использовании в качестве модельного ксенобиотика ЭТК	19
1.3.2.1.2. Синтез трифторметилированных производных непиранового ряда на основе 6-(трифторметил)комановой кислоты	26
1.3.2.1.2.1. Синтез трифторметилированных 3-(пиразолил)индолов	26
1.3.2.1.2.2. Региоселективный синтез 2- и 5-трифторметилпиразоло[1,5-с]пиримидинов на основе 7,7,7-трифтор-2,4,6-триоксогептановой и 6-(трифторметил)-комановой кислот	37
1.3.2.1.3. Исследование структурных изменений в растениях под действием ЭТК. Влияние на специализированные структуры накопления вторичных метаболитов	46
1.3.2.2. Метаболизм в интактном растении. Распределение метаболитов по	

органам и тканям растений. Внешняя секреция	56
1.4 Теоретические исследования в области хемосистематики	57
1.5. Анализ спектральных данных	60
1.6. Экспериментальная часть	61
1.7. Отчет по обобщению и оценке результатов исследований	67
1.8. Публикации результатов НИР	68
2. Заключение	98
3. Список используемых источников	100
Приложение 1. Спектр ЯМР ^1H этил <i>цис</i> -4-гидрокси-6-(трифторметил)- 5,6-дигидро-4 <i>H</i> -пиран-2-карбоксилата	105
Приложение 2. Копия диплома доктора наук	106
Приложение 3. Копия благодарственного письма	107

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Настоящий отчет составлен с использованием положений ГОСТ 7.32-2001

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями

Расщепление сигнала в ЯМР спектре – результат спин-спиновго взаимодействия магнитного ядра атома на других магнитных ядрах, проявляющееся расщеплением сигнала в мультиплет.

Гиперконъюгация – *син.* сверхсопряжение, перекрывание между σ - и π -связями.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ЭТК	этил 6-(трифторметил)команоат
BMBC	внутримолекулярная водородная связь
J	константа спин-спинового взаимодействия (КССВ)
ЭУ	электронный удар
$[M^+]$	молекулярный ион
DMCO-d ₆	дейтеродиметилсульфоксид
$I_{отн}$	относительная интенсивность сигнала в масс-спектре
с	синглет; секунда
д	дублет
т	триплет
д.д	дублет дублетов
д.кв	дублет квартетов
уш.с	уширенный синглет
м.д.	миллионные доли (размерность шкалы в спектрах ЯМР)
НВМО	низшая вакантная молекулярная орбиталь

ВВЕДЕНИЕ

Биосинтез в растительной клетке с участием ксенобиотиков – одно из наиболее значимых направлений в современной биотехнологии. Результаты исследований в этом направлении могут быть применены в производстве фармацевтических препаратов, новых материалов, при изучении процессов метаболизма, иммунной системы растений и др. Метаболизм неприродных ксенобиотиков является приоритетной задачей при изучении вторичных эффектов, вызванных употреблением лекарственных препаратов. Другим важным направлением в этой области является исследование метаболизма техногенных экотоксикантов. Метаболизм малотоксичных (нетоксичных) соединений синтетического происхождения остается наиболее малоисследованным вопросом. Разнообразие форм метаболизма позволяет исследовать живые системы как в фундаментальном, так и прикладном направлениях.

Целями и задачами данного исследования является синтез, исследование влияния на развитие растений и процессы метаболизма трифторметилированных производных пирана, и направлены не только на получение новых фундаментальных знаний о биосинтетических возможностях растительных клеток и интактных растений, но также на определение практической значимости использования таких субстратов в биотехнологических процессах.

1. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Проведение III этапа исследований по проблеме: «Влияние трифторметилированных производных пирана и их циклоаддуктов на развитие растений и процессы метаболизма»

1.1. Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I этапе

Целями и задачами данного исследования является синтез, исследование влияния на развитие растений и процессы метаболизма трифторметилированных производных пирана и их циклоаддуктов. Исследование метаболизма трифторметилированных ксенобиотиков пирановой группы и их производных, в т.ч. серусодержащих и азотистых производных, а также их циклоаддуктов с донорными диенами и диенофилами направлено не только на получение новых фундаментальных знаний о биосинтетических возможностях растительных клеток и интактных растений, но также позволит определить практическую значимость использования таких субстратов в биотехнологических процессах.

На I этапе получены следующие результаты.

Выполнен аналитический обзор по фторсодержащим метаболитам, в том числе проработаны следующие вопросы:

- влияние атома фтора на свойства ксенобиотиков;
- замещение двух атомов фтора в метиленовой группе;
- замещение трех атомов фтора в метильной группе;
- влияние «эффекта фторного замещения» на скорость метаболизма;
- метаболизм с участием соединений, содержащих фторированные ароматические заместители.

Выполнен выбор обоснованного варианта направления исследований в области биологической активности трифторметилированных производных пирана.

Представлен план проведения экспериментальных и теоретических исследований I этапа.

Представлены результаты экспериментальных исследований:

- синтез трифторметилированных производных пирана;
- синтез циклоаддуктов трифторметилированных 2-пиранов с донорными диенами и диенофилами;

Выращивание опытных образцов растений.

выращены основные опытные растения I этапа:

- выращены проростки полыни обыкновенной в условиях ксенобиотического воздействия трифторметилированных производных пирана, их серусодержащих и азотистых аналогов: трифторметилированных производных тиопирана и 4-гидроксипиридина;

- получены предварительные данные о влиянии трифторметилированных производных пирана на развитие растений полыни обыкновенной;

- выращены взрослые растения девясила высокого и растений рода *Echinacea* в условиях воздействия трифторметилированных производных пирана, их серусодержащих и азотистых аналогов: трифторметилированных производных тиопирана и 4-гидроксипиридина.

Выполнены теоретические исследования:

- теоретическое исследование влияния трифторметильной группы на процессы метаболизма;

- теоретическое исследование распределения трифторметилированных метаболитов в клетках и тканях растений.

Выполнены дополнительные работы:

- химический стресс под действием трифторметилированных ксенобиотиков пирановой группы и способы его подавления. Выживаемость и развитие растительного материала в условиях ксенобиотического стресса.

Приведено обобщение и дана оценка результатов исследований.

В результате работ, выполненных на I этапе, были получены новые трифторметилированные производные пирана и их циклоаддукты. Строение полученных соединений строго доказано современными физико-химическими методами.

Выращены молодые растения в средах, содержащих исследуемые ксенобиотики и показано, что эти соединения являются малотоксичными по отношению к проросткам полыни.

Обнаружено, что трифторметилированные производные пирана существенно влияют на развитие молодых растений. Подобраны условия, подавляющие и сглаживающие химический стресс, что, с одной стороны, позволяет молодым растениям адаптироваться в новых ксенобиотических условиях, а с другой стороны, позволяет использовать в экспериментах относительно высокие концентрации трифторметилированных производных пирана.

Выполненные работы отвечают требованиям современного научно-технического уровня.

-синтезированы новые трифторметилированные производные пирана и их циклоаддукты, строение которых строго доказано современными физико-химическими методами;

-выполнен аналитический обзор по фторсодержащим метаболитам, позволивший оценить возможные пути метаболизма исследуемых трифторметилированных ксенобиотиков;

-сделан обоснованный вариант направления исследований в области биологической активности трифторметилированных производных пирана;

-выращены образцы молодых растений и показано, что исследуемые трифторметилированные ксенобиотики являются малотоксичными и могут использоваться в концентрациях, больших, чем 0.1%;

-выполнены работы по исследованию химического стресса, оказываемого ксенобиотиками на проростки, в результате чего удалось найти подходы для адаптации молодых растений в условиях высоких концентраций трифторметилированных производных.

-решения поставленных задач выполнены в полном объеме;

-полученные результаты позволяют рекомендовать исследуемые малотоксичные трифторметилированные соединения для изучения их биологически активных и других полезных свойств.

1.2. Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на II этапе

На II этапе выполнен синтез новых трифторметилированных производных пирана, исследован ряд метаболических процессов под действием растений. Впервые были получены результаты по метаболизму трифторметилированных производных пирана, в частности, обнаружены процессы восстановления кратных связей в пирановом кольце, что было подтверждено данными спектроскопии ^{19}F и хромато-масс-спектрометрии. Определен ряд специфических свойств некоторых трифторметилированных производных пирана, влияющих на развитие высших растений и микроводорослей. Выполнены измерения газообмена о показано существенное влияние трифторметилированных ксенобиотиков на процессы транспирации. Установлено, что такие трифторметилированные пираны, как 6-(трифторметил)комановая кислота и ее производные претерпевают окислительно-восстановительный метаболизм под действием растений (их тканей, клеток, органов), что позволяет получать трифторметилированные производные дигидро- и тетрагидропирана. Впервые установлено, что метаболическому восстановлению в трифторметилированных пиранах подвергается двойная связь $\text{C}=\text{C}-\text{CF}_3$, то есть двойная связь при группе CF_3 .

Отчет по работе состоит из следующих разделов.

Аналитический обзор по биологической активности производных пирана, бициклических и трициклических сесквитерпенов, который содержит материал по различным видам биологической активности сесквитерпенов и их производных.

Выбор и обоснование оптимального варианта направления исследований в области биологической активности производных пирана, бициклических и трициклических сесквитерпенов. В этом разделе показано, что трифторметилированные производные пирана хоть и являются прекурсорами соответствующих трифторметилированных сесквитерпенов, они относятся к ксенобиотикам, т.к. содержат трифторметильную группу, которая в природных сесквитерпенах и их прекурсорах отсутствует. Поэтому одной из важнейших задач является определение основного пути, по которому пойдет метаболизм трифторметилированных производных пирана, и какие ферменты в первую очередь будут воздействовать на эти соединения (гидролазы, оксидазы, редуктазы и пр.) и какие метаболиты образуются в результате биотрансформации. Поэтому оптимальным направлением исследований является определение протекающих путей метаболизма трифторметилированных производных пирана и выявление ряда биологически активных свойств. На основании данных о направлении метаболизма, предлагается определить роль трифторметилированных ксенобиотиков в биохимических процессах и практическую

значимость, которая основана на выделении биологически активных фторсодержащих метаболитов.

Экспериментальные исследования, представленные в работе включают:

- создание методик исследования процессов метаболизма с использованием в качестве объектов исследования интактных растений (проростков);
- создание методик исследования процессов метаболизма с использованием в качестве объектов исследования тканей и органов растений;
- создание методик исследования процессов метаболизма с использованием в качестве объектов исследования иммобилизованных клеток;
- микроскопические, хроматографические, масс-спектрометрические, хромато-масс-спектрометрические исследования. Исследования методом ЯМР-спектроскопии;
- исследование влияния внешних условий;
- синтез новых производных с потенциальной биологической активностью

Теоретические исследования включают:

- анализ спектральных данных.

Результаты экспериментальных исследований, полученных в ходе выполнения работ включают:

- создание методик исследования процессов метаболизма с использованием в качестве объектов исследования тканей и органов растений.**

Данный подход оказался наиболее удобным при работе с трифторметилированными производными пирана. Большое количество экспериментов показало, что первые стадии метаболизма в некоторых случаях проявляются уже в первые минуты экспозиции. В качестве исходного растительного материала использовали стерилизованные (в ряде случаев, нестерилизованные) ткани листьев, и корней, измельченные листья и корни без дифференциации по видам тканей, срезы корневищ. Среди ряда экспериментов, удалось подобрать оптимальные условия для проведения биохимических превращений трифторметилированных ксенобиотиков.

- исследование метаболизма трифторметилированных пиранов под действием корневищ моркови.** Разработанный подход впервые позволил осуществить синтез трифторметилированных производных дигидро- и тетрагидропирана, которые ранее не были доступны. Эти производные представляют большой интерес для изучения их биологической активности.

- гидролиз этил 6-(трифторметил)команоата под действием листьев осота огородного.** В отличие от корневищ, листья растений не проявили сколько-нибудь

выраженной восстановительной активности по отношению к трифторметилированным пиронам. Вместо этого наблюдался достаточно быстрый гидролиз сложноэфирной группы до карбоксильной группы.

-метаболизм трифторметилированных пиранов под действием каллусных культур моркови и иммобилизированных клеток. Использование каллусных культур позволило осуществлять глубокий метаболизм трифторметилированных производных пирана до низкомолекулярных открытоцепных соединений.

-синтез производных 3-(пиразолил)индола на основе комановой кислоты.

Показано, что из комановой кислоты и фенилгидразина могут быть получены региоизомерные 3-(*N*-фенилпиразолил)индол-2-карбоновые кислоты, представляющие интерес для медицинской химии, т.к. наличие гидрофильных заместителей в молекулах лекарственных препаратов, как правило, благоприятно влияет на их фармакологические свойства вследствие увеличения растворимости в водных средах.

-синтез циклоаддуктов трифторметилированных производных пирана с норборнадиеном и циклопентадиеном. Получены новые трифторметилированные циклоаддукты, необходимые для исследования процессов метаболизма.

-исследование влияния внешних условий на метаболизм (концентрации кислорода и углекислого газа, уровня освещения). Установлено, что максимальный положительный эффект на транспирацию оказывает этил 4-гидрокси-6-(трифторметил)пиридин-2-карбоксилат (+1.56), тогда как наибольший отрицательный эффект – 6-(трифторметил)-4-оксо-4*H*-пиран-2-карбоновая кислота (–0.81).

В ходе выполнения работ по II этапу получен ряд важнейших результатов по метаболизму трифторметилированных производных пирана. Среди наиболее ценных результатов является первый синтез трифторметилированных производных дигидропирана и тетрагидропирана, который, во-первых, подтверждает существование редуктаз, способных восстанавливать двойную C=C-связь, связанную с группой CF₃, а во-вторых делает доступными новые трифторметилированные производные с потенциальной биологической активностью.

1.3. Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований (III этап)

1.3.1. Аналитический обзор по биосинтезу алкалоидов

Алкалоиды – природные биологически активные соединения, содержащие основной атом азота. В биосинтезе алициклических алкалоидов, как правило, задействованы следующие последовательные стадии: декарбоксилирование, метилирование, трансаминирование, альдольная реакция, реакция Кляйзена, окисление. Аналогичные реакции происходят и в случае биосинтеза ароматических алкалоидов, однако, к вышеупомянутым реакциям можно добавить стадию образования изохинолинового ядра (в случае алкалоидов изохинолинового ряда) путем конденсации между соответствующими амином и альдегидом. Широкое семейство алкалоидов составляют монотерпеноидные индольные алкалоиды [1,2]. Большинство из этих соединений являются биологически активными для млекопитающих. Особую роль в биосинтезе монотерпеноидных индольных алкалоидов играет триптофан-декарбоксилаза, которая декарбоксилирует *L*-триптофан до протоалкалоидного триптамина. Стриктозидин-синтаза (ЕС 4.3.3.2) катализирует стереоспецифическую конденсацию первичных аминогрупп аминов с альдегидным фрагментом иридоидного глюкозида секологанина с образованием монотерпеноидного индольного алкалоида 3 α (*S*)-стриктозидина. Стриктозидин-синтаза имеет большое биотехнологическое значение в биомиметическом синтезе монотерпеноидных индольных алкалоидов, т.к. несмотря на то, что конденсацию триптамина с секологанином можно осуществить химическим путем, эта реакция протекает не стереоселективно, с образованием смеси диастереомерных продуктов. В отдельную группу можно выделить тропановые и никотиновые алкалоиды, общим прекурсором в биосинтезе которых является *N*-метил- Δ^1 -пирролиниевый катион. Ферментология и молекулярная биология биосинтеза тропанового алкалоида скополамина в *Hyoscyamus* хорошо исследована [3]. В биосинтезе скополамина также принимает участие специфический фермент тропинон-редуктаза I (ЕС 1.1.1.236). *к*ДНК, кодирующая этот фермент была выделена из *Datura stramonium* [4]. На последней стадии биосинтеза тропановых алкалоидов принимает участие гиосциамин-6 β -гидролаза (гиосциамин-[6*S*]-диоксигеназа; ЕС 1.14.11.11) [5]. Очень широким и распространенным классом алкалоидов является класс бензилизохинолиновых алкалоидов. Это семейство алкалоидов содержит такие биологически активные представители ряда алкалоидов, как эметин, колхицин, береберин, сангвинарин и др. Одну из основных ролей в биосинтезе берберина играет фермент берберинового мостика ([*S*]-ретикулин:кислород оксидоредуктаза; ЕС 1.5.3.9) [6].

Класс бисбензилизохинолиновых алкалоидов насчитывает более 270 представителей. Бербамунин-синтаза (*N*-метилкоклаурин; ЕС 1.1.3.34; CYP80) катализирует образование химической связи между одной молекулой (*R*)-*N*-метилкоклаурина и одной молекулой (*S*)-*N*-метилкоклаурина, что приводит к образованию бисбензилизохинолинового алкалоида бербамунина [7]. Пирановые алкалоиды представляют собой более редкий класс соединений, чем монотерпеноидные индольные алкалоиды и бензилизохинолиновые алкалоиды. 2,2-Диметил-2*H*-пирановое производное, алкалоид акроницин впервые был выделен из *Acronychia baueri* [8a]. Методом рентгеноструктурного анализа доказано строение пирановых алкалоидов: (+)-тазеттина ((+)-(3*S*,4*aS*,6*aS*,13*bS*)-3-метокси-5-метил-3,4,4*a*,5,6,6*a*-гексагидро-8*H*,11*H*-[1,3]диоксоло[6,7][2]бензопирано[3,4-*c*]индол-6*a*-ола), (+)-3-эпимакронина ((+)-(3*S*,4*aS*,6*aR*,13*bS*)-3-метокси-5-метил-3,4,4*a*,5,6,6*a*-гексагидро-8*H*,11*H*-[1,3]диоксоло[6,7][2]бензопирано[3,4-*c*]индол-8-она) выделенных из *Galanthus plicatus* и (+)-3-*O*-диметилкривеллина ((+)-(3*R*,4*aS*,6*aS*,13*bS*)-5-метил-3,4,4*a*,5,6,6*a*-гексагидро-8*H*,11*H*-[1,3]диоксоло[6,7][2]бензопирано[3,4-*c*]индол-3,6*a*-диола, выделенного из *Galanthus gracilis* [8b].

1.3.2. Выбор и обоснование оптимального варианта направления исследований в области анализа метаболизма и структурных изменений в клетках и тканях растений под действием трифторметилированных производных пирана

На ткани растений может влиять как сам ксенобиотик, так и продукты его метаболизма. Однако, многие промежуточные метаболиты могут оказаться малоустойчивы, вследствие участия в последующих метаболических цепочках внутри клетки растения. Но, естественно, это не означает, что в момент образования они никак не влияют на растение. Поэтому, возможные метаболиты лучше сначала определять с использованием тканей растений, погруженных в водную среду: в этом случае в водной среде можно зафиксировать метаболиты, которые не удастся определить в интактных растениях. Фиксировать метаболиты целесообразно с помощью метода ЯМР ^{19}F спектроскопии (для фторсодержащих) и хромато-масс-спектрометрии (для фторсодержащих и нефторированных). Для изучения структурных изменений в растениях необходимо выбирать образцы молодых быстрорастущих растений (напр., злаки), находящихся на стадии интенсивного роста и развития (до 40 дней с момента всходов). Для подтверждения строения всех новых соединений необходимо использовать методы ЯМР ^1H , ^{19}F , ^{13}C и ИК спектроскопии, элементный анализ.

1.3.2.1. Исследование структурных изменений в клетках и тканях растений, возникающих под ксенобиотическим воздействием. Влияние ксенобиотического воздействия на специализированные структуры накопления вторичных метаболитов, и на внешнюю секрецию растений

1.3.2.1.1. Определение возможных метаболитов при использовании в качестве модельного ксенобиотика ЭТК

Распределение метаболитов в интактных растениях зависит от многих факторов: свойств самого растения (принадлежность к определенному семейству, роду, наличие видовых особенностей), свойств метаболита (гидрофильность, липофильность, способность образовывать пептидные конъюгаты, проницаемость через клеточные стенки), внешних условий (влажность, освещенность) и др. Если в случае метаболизма под действием клеток и тканей растений, метаболиты в основном переходят в питательную среду, то в случае целых растений, они могут аккумулироваться в специализированных структурах – группах клеток, ответственных за накопление или внешнюю секрецию метаболитов, идиобластах (склереиды, млечники, проточники, цистолиты и др.). Поэтому, накопление метаболитов в определенных частях растения, как правило, является результатом работы идиобластов.

Для изучения распределения метаболитов трифторметилированных производных пирана в растениях и их влияния на идиобласты сначала был изучен метаболизм ЭТК под действием тканей моркови, капусты белокочанной, картофеля, огурца и яблока с целью определения возможных метаболитов, которые могут образовываться при метаболизме ЭТК в клетках интактных растений. Для этого в 100 мл 0.1%-ного раствора ЭТК в дистиллированной воде помещали 40 г измельченных тканей одного из растений и полученную смесь держали во вращающейся колбе (20 об/мин) в течение 24 ч. Метаболиты извлекали четырехкратной экстракцией дважды перегнанным Et₂O при предварительном добавлении в водный раствор 3-х капель 22%-ной HCl (ОСЧ). После отгонки Et₂O из экстракта, остаток подвергался анализу методами ЯМР ¹H, ¹⁹F и ¹³C спектроскопии и ГЖХ-хромато-масс-спектрометрии.

Нами найдено, что при метаболизме ЭТК **1** под действием тканей моркови, уже в первые минуты наблюдалось образование продукта гидролиза, 6-(трифторметил)комановой кислоты **2**. Через 24 ч весь сложный эфир **1** перешел в кислоту **2**. Такое направление метаболизма является достаточно необычным, т.к. хорошо известно, что различные кетоэфиры подвергаются под действием тканей различных растений

окислительно-восстановительному метаболизму с образованием в качестве продуктов восстановления эфиров гидроксикарбоновых кислот; при этом сложноэфирная группа не подвергалась гидролизу [9,10] (схема 1). Причем метод биовосстановления тканями моркови и других растений [9], а также суспензионными клеточными культурами *M. polymorpha*, *Marchantia plicata*, *Riccia fluitans* и *Asterella blumeana* был предложен в качестве одного из более доступных подходов к энантиоселективному синтезу гидроксиэфиров, т.к. оксо-редуктаза, кофактор, и их регенеративная система находятся внутри растительной клетки, что позволяет избежать добавления дорогостоящего кофактора в реакцию систему [9].

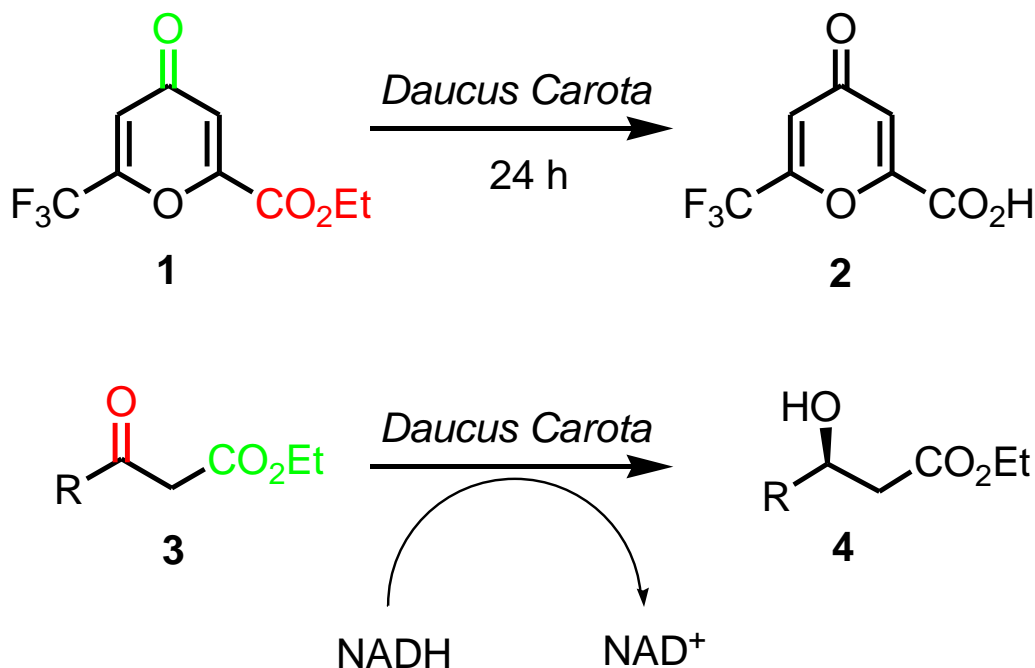


Схема 1. Зеленым цветом отмечены группировки, не участвующие в превращениях. Красным цветом отмечены заместители, претерпевающие химические превращения.

Метаболизм **1** под действием тканей капусты белокочанной протекал двумя путями: по пути гидролиза **1**→**2** и по пути восстановления **1** до этил *цис*-4-гидрокси-6-(трифторметил)-5,6-дигидро-4*H*-пиран-2-карбоксилата **5** (реакция **1**→**5**) (схема 2). По данным спектра ЯМР ^1H , соединение **5** находится в *Z*-изомерной форме, т.е. группы OH и CF_3 расположены по одну сторону шестичленного цикла. Так, в спектре наблюдается характеристический сигнал протона H^{5a} , проявляющийся в виде дублета дублетов дублетов (д.д.д) при δ 1.91 м.д. с константами спин-спинового взаимодействия (J), равными 13.2 Гц ($J_{\text{H}^{5a},\text{H}^{5e}}$), 12.0 Гц ($J_{\text{H}^{5a},\text{H}^{6a}}$) и 9.6 Гц ($J_{\text{H}^{5a},\text{H}^{4a}}$). Значения последних двух констант (12.0 и 9.6) свидетельствуют о наличии по соседству с протоном H^{5a} двух аксиальных протонов, H^{4a} и H^{6a} [11]. При этом пространственно более затрудненные, чем

водород, заместители, CF_3 и OH занимают экваториальные положения в конформации полукресла (рис. 2). Отнесение сигналов протонов пиранового кольца метаболита **5** приведены в таблице 1. Согласно данным таблицы 1, атомы пиранового кольца H^{5e} , H^{6a} , H^{4a} и $\text{H}-3$ проявляются в спектре ЯМР ^1H в виде характеристических сигналов, однозначно подтверждающих строение метаболита **5** (наблюдаются все типы спин-спинового взаимодействия, характерные для протонов пиранового кольца соединения **5**). Так, протон H^{5e} участвует в спин-спиновом взаимодействии с геминальным протоном H^{5a} с соответствующей КССВ, равной 13.2 Гц. В то же время, спин-спиновое взаимодействие между экваториальным протоном H^{5e} и вицинальным аксиальным протоном H^{4a} должно дать существенно меньшее значение КССВ (значения КССВ для аксиально-аксиального взаимодействия примерно в 2 раза выше, чем для аксиально-экваториального), что и наблюдалось: $(J_{\text{H}^{5e},\text{H}^{4a}}) = 6.7$ Гц. В связи с тем, что величины $J_{\text{H}^{5e},\text{H}^{6a}}$ и $J_{\text{H}^{5e},\text{H}^3}$ (2.3 и 2.0, соответственно), сигнал протона H^{5e} выглядит как дублет дублетов триплетов (д.д.т), хотя, на самом деле, по сути, является дублетом дублетов дублетов (д.д.д.д), в котором четыре пары компонент с почти равными КССВ (дублеты с J 2.3 и 2.0 Гц) перекрылись, внешне выдавая себя за четыре триплета. Аксиальный протон H^{6a} проявился в виде характеристического дублета квартета дублетов 12.0 Гц ($J_{\text{H}^{6a},\text{H}^{5a}}$), 6.0 Гц ($J_{\text{H}^{6a},\text{CF}_3}$), 2.3 Гц ($J_{\text{H}^{6a},\text{H}^{5e}}$). При этом наличие КССВ, отвечающей за расщепление в квартет, и равной 6.0 Гц свидетельствует о том, что это именно протон H^{6a} , т.е. протон, сближенный с CF_3 группой, что приводит к расщеплению его сигнала в квартет с $J_{\text{H}^{6a},\text{CF}_3} = 6.0$ Гц. Эта же КССВ (6.0 Гц) наблюдается в спектре ЯМР ^{19}F , где трифторметильная группа проявилась в виде дублета с $J_{\text{CF}_3,\text{H}^{6a}} = 6.0$ Гц. Аксиальный протон H^{4a} проявился в виде неразрешенного сигнала (мультиплета) за счет наложения взаимодействий H^{4a},OH ; $\text{H}^{4a},\text{H}-3$; $\text{H}^{4a},\text{H}^{5a}$; $\text{H}^{4a},\text{H}^{5e}$. Винильный протон $\text{H}-3$ проявился в виде дублета дублетов, который из-за равенства КССВ $J_{\text{H}^3,\text{H}^{5e}} = J_{\text{H}^3,\text{OH}} = 2.0$ Гц внешне выглядит как триплет. От настоящего триплета его можно отличить по соотношению интенсивностей компонент сигнала. Соединение **5** было выделено в аналитически чистом состоянии и охарактеризовано помимо спектров ЯМР ^1H и ^{19}F элементным анализом и ИК спектроскопией.

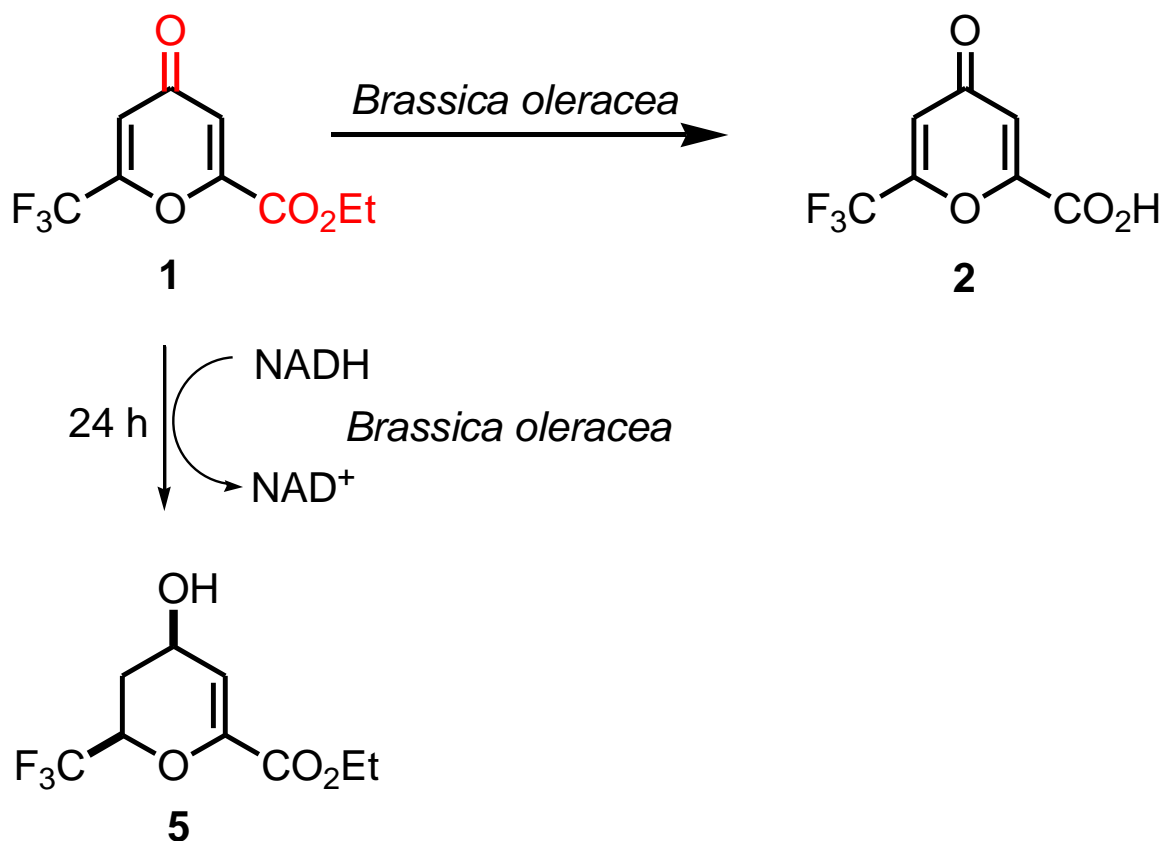


Схема 2.

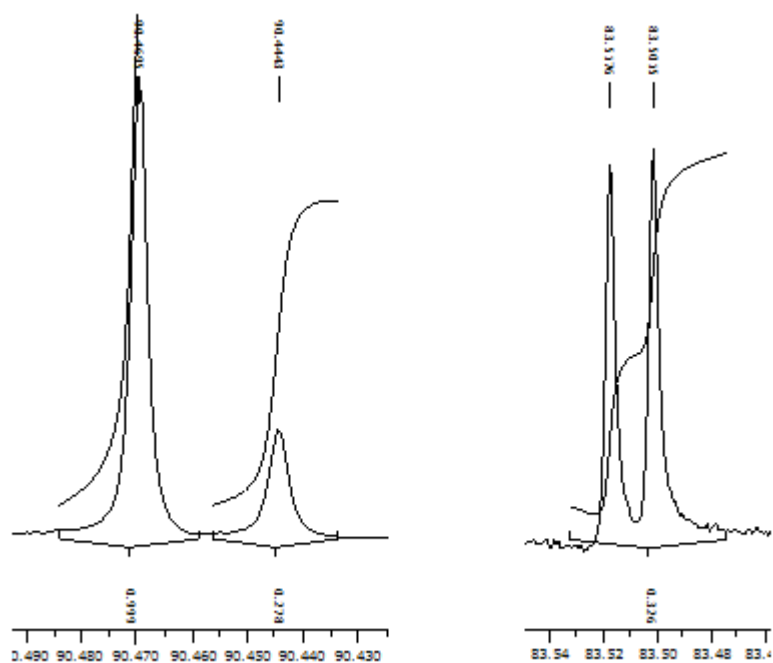


Рис. 1. Спектр ^{19}F ЯМР трифторметилированных метаболитов: слева – синглеты исходного этил 6-(трифторметил)команоата и 6-(трифторметил)комановой кислоты, справа – дублет трифторметильной группы метаболита 5.

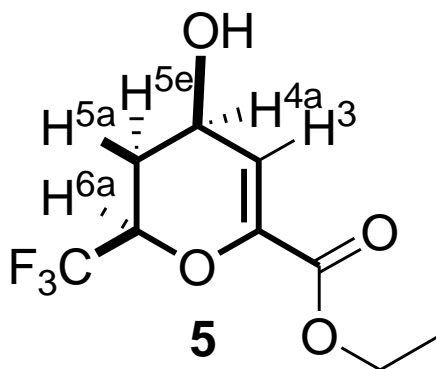


Таблица 1. Отнесение сигналов протонов молекулы метаболита **5**.

Протон	Химический сдвиг (δ , м.д.)	Тип расщепления	Внешний вид сигнала	КССВ (J , Гц)
H^{5a}	1.91	д.д.д		13.2 ($J_{H^{5a},H^{5e}}$) 12.0 ($J_{H^{5a},H^{6a}}$) 9.6 ($J_{H^{5a},H^{4a}}$)
H^{5e}	2.43	д.д.д.д		13.2 ($J_{H^{5e},H^{5a}}$) 6.7 ($J_{H^{5e},H^{4a}}$) 2.3 ($J_{H^{5e},H^{6a}}$) 2.0 (J_{H^{5e},H^3})
H^{6a}	4.39	д.к.д		12.0 ($J_{H^{6a},H^{5a}}$) 6.0 (J_{H^{6a},CF_3}) 2.3 ($J_{H^{6a},H^{5e}}$)
H^{4a}	4.66	м		—
H^3	6.08	д.д		2.0 ($J_{H^3,H^{5e}}$) 2.0 ($J_{H^3,OH}$)

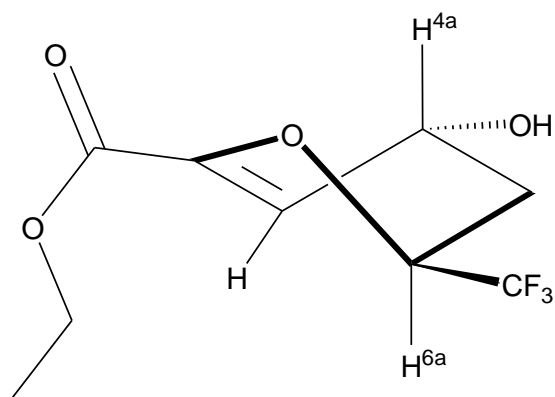


Рис. 2. Пространственное расположение заместителей в метаболите **5**. Функциональные группы CF_3 и OH занимают экваториальные положения при атомах C-6 и C-4.

Соединение **5** представляет большой интерес для изучения его биологически активных свойств, т.к. близкие по строению нефторированные производные дигидропиранола ранее использовались в синтезе псевдаминной кислоты [12] (схема 3).

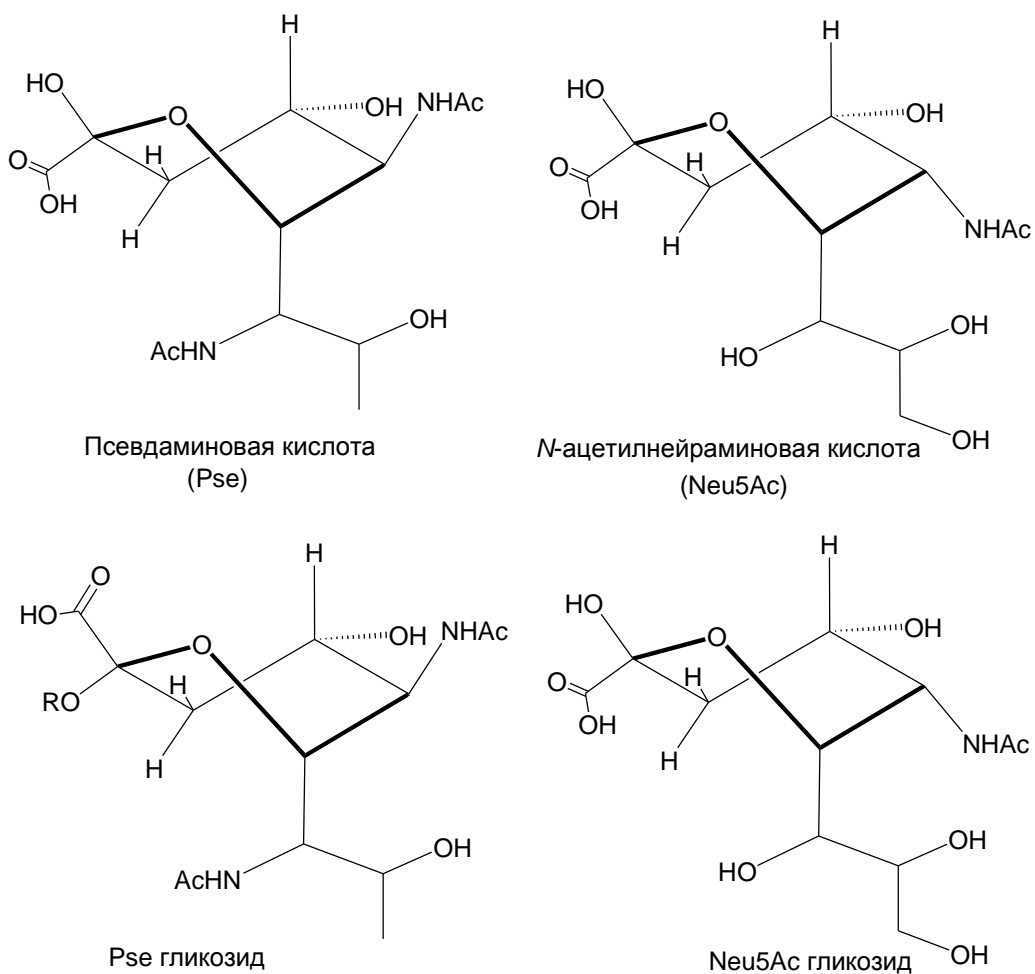


Схема 3.

Кроме того, аналогичный структурный фрагмент входит в состав биологически активных молекул: *N*-ацетилнейраминовой кислоты, Pse гликозида и Neu5Ac гликозида (схема 3).

Наиболее глубокий метаболизм пирона **1** наблюдался при использовании в качестве растительного материала тканей клубня картофеля. Методом ГЖХ-хромато-масс-спектрометрии, в качестве метаболита, обнаружен 3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазин **6** (схема 4). Этот метаболит не является фторсодержащим, однако, он, безусловно, индуцируется ЭТК **1**, что было подтверждено холостыми опытами (ткани клубня картофеля обрабатывались дистиллированной водой без добавления ЭТК, экстракты из водного раствора подвергались анализу). По-видимому, образование 3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазина **6** связано с участием в процессах дезактивации трифторметилированных метаболитов молекул белковой природы, которые разрушаются с экструзией аминокислот (3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазин является продуктом циклодимеризации лейцина – аминокислоты, широко представленной в протеинах картофеля).

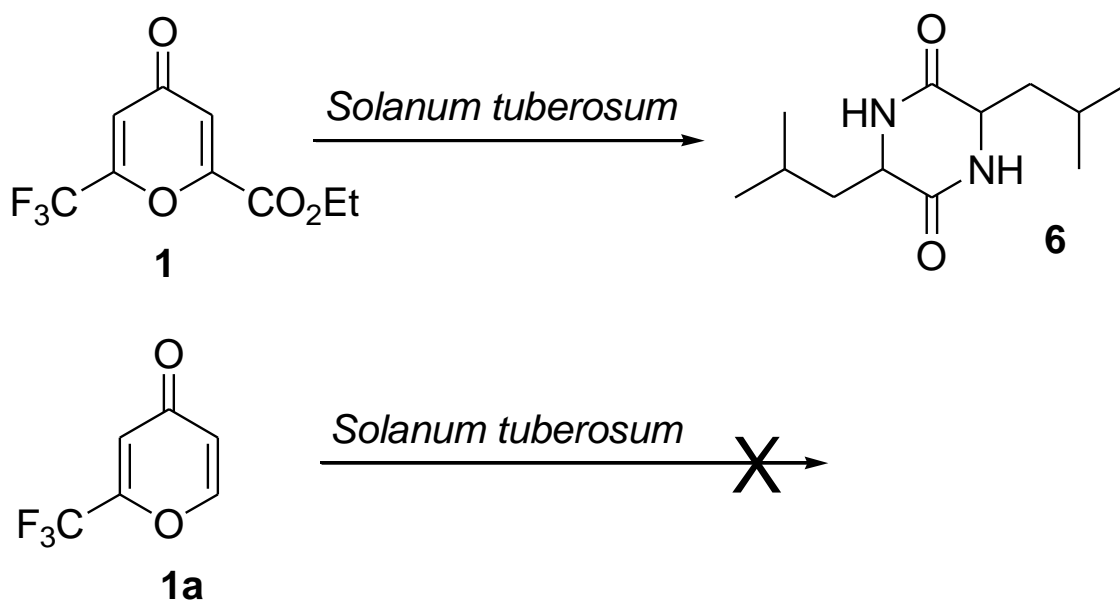


Схема 4.

Интересно, что ткани плодов яблони и огурца индифферентны к ЭТК. Обработка измельченных тканей плодов этих растений данным ксенобиотиком в аналогичных условиях (24 ч, 30 °C) не позволила обнаружить продукты метаболизма в сколько-нибудь значительных количествах. Остаток после растворения растворителя (диэтилового эфира) из экстракта представлял собой почти аналитически чистый ЭТК. В то же время, изучение

в метаболических экспериментах родоначальника 2-(трифтормети)-4-пионов, 2-(трифторметил)-4*H*-пиран-4-она **1a**, с использованием тканей клубня картофеля, показало отсутствие биокаталитической активности данного растительного материала по отношению к **1a**. Экстракт органических соединений из ксенобиотической среды показал наличие в качестве основного компонента исходный пирон **1a**, а также примесь янтарной кислоты (менее 1%).

1.3.2.1.2. Синтез на трифторметилованных производных непиранового ряда основе 6-(трифторметил)комановой кислоты

1.3.2.1.2.1. Синтез трифторметилованных 3-(пиразолил)индолов.

Выше было показано, что трифторметилованное производное пирана, этил 6-(трифторметил)команоат активно подвергается растительному метаболизму причем направление и селективность метаболизма исключительно сильно зависят от вида растения. Однако, трифторметилованные производные пирана могут представлять большой интерес не только при самостоятельном использовании в качестве фторсодержащих ксенобиотиков, но так же на их основе могут быть синтезированы другие трифторметилованные гетероциклические системы, представляющие интерес для изучения их влияния на растения. Одним из наиболее интересных классов соединений, который, как оказалось, может быть получен на основе трифторметилованных пионов, является класс трифторметилованных 3-(пиразолил)индолов.

Индольное ядро широко распространено в природе и играет особую роль в процессах метаболизма практически всех живых существ. Триптофан **7** (или 2-амино-3-(1*H*-индол-3-ил)пропионовая кислота), является незаменимой для человека аминокислотой индольного ряда, а ближайший аналог триптофана, 5-гидрокситриптофан **8** (5-НТР) относится к группе биологически активных индолов, обладающих антидепрессантными, седативными и другими свойствами, и широко используется в качестве биодобавки. Индольные алкалоиды являются широчайшей группой природных биологически активных веществ, разработкой методов синтеза которых занимались многие десятилетия, и до сих пор занимаются в различных лабораториях мира. Что же касается 3-(пиразолил)индолов, то этот ряд соединений начал исследоваться относительно недавно, вследствие обнаруженных новых биологически активных свойств. Можно выделить две группы производных 3-(пиразолил)индола **9**: это производные 3-(пиразол-5-ил)индола **9a** и изомерные им производные 3-(пиразол-3-ил)индола **9b** (схема 5).

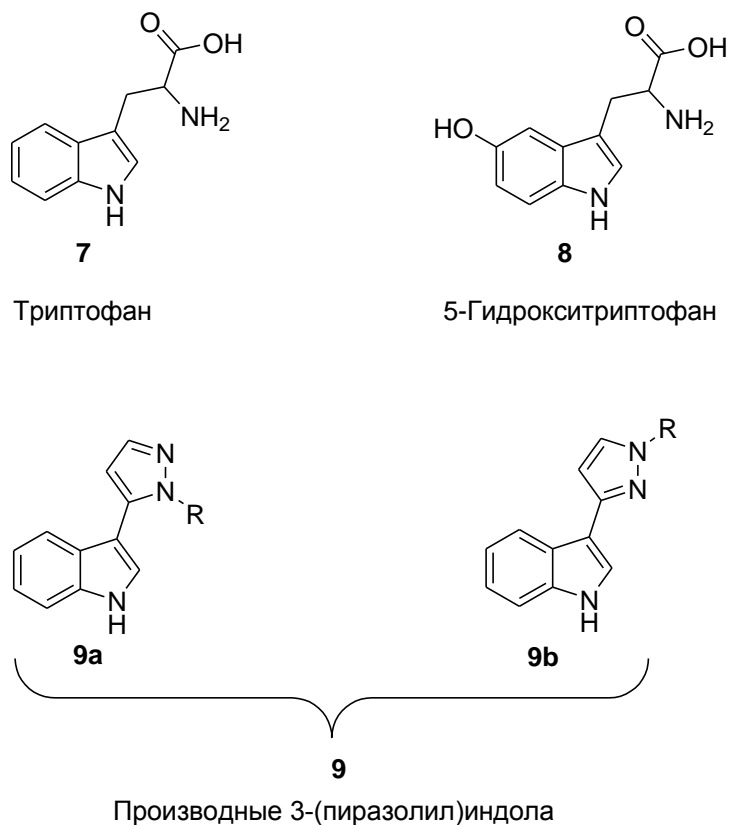


Схема 5.

Мы обнаружили, что такие трифторметилированные производные пирана, как 6-(трифторметил)комановая кислота 2 и ее производные могут использоваться в синтезе 3-(пиразолил)индолов содержащих во 2-м положении индольного ядра трифторметильную группу. Подобного рода индолы до сих пор не были известны и найденная нами возможность их синтеза существенно увеличивает значимость трифторметилированных пиранов в медицинской химии.

Недавно нами было обнаружено [13], что реакции несимметрично замещенных полиэлектрофильных субстратов, 2-CF₃-4-пиранов, таких как 6-(трифторметил)комановая кислота и ее производные с фенилгидразином исключительно чувствительны к природе растворителя. Обработка этих пиранов фенилгидразином в полярном протонном растворителе давало производные 5-[3,3,3-трифтор-2-(фенилгидразино)пропил]-1-фенил-1*H*-пиразол-3-карбоновой кислоты **11**, тогда как в апротонном растворителе реакция приводила к образованию региоизомерных производных 3-[3,3,3-трифтор-2-(фенилгидразино)пропил]-1-фенил-1*H*-пиразол-5-карбоновой кислоты **12**.

Мы нашли, что региоизомерные интермедиаты **11** и **12**, полученные из 6-(трифторметил)комановой кислоты и ее производных, могут быть использованы в региоконтролируемом синтезе ряда трифторметилированных 3-(пиразолил)индолов (схема 6) [14].

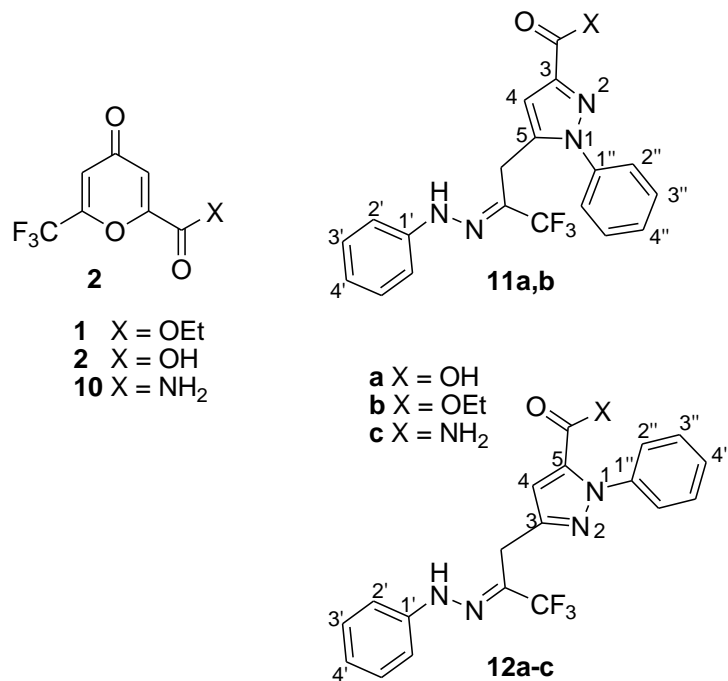


Схема 6.

Трифторметилированные индолы нельзя отнести к широко распространенной группе соединений. Эти фторсодержащие гетероциклы привлекают внимание благодаря наличию в их молекулах двух фармакофорных фрагментов: индольного кольца и трифторметильной группы. В литературе описано несколько методов синтеза трифторметилированных и других R^F-содержащих индолов. 2-(Трифторметил)индол и его 3-замещенные производные ранее были получены обработкой фторированных *N*-[2-(галогеналкил)фенил]имидоил хлоридов магнием [15,16], через 1-[2-(2-нитрофенил)-1-(трифторметил)винил]пирролидин и цинк [17], из *N*-(2-(бромметил)фенил)трифторацетамида и трифенилфосфина [18], из 2-метил-*N*-триметилсилиланилина и этилтрифторацетата [19], фотохимическим трифторметилированием *N*-(триметилсилил)индола CF₃I [20], и индола CF₂I₂ [21], радикальным трифторметилированием индола CF₃I в присутствии соединений Fe(II) [22] и бис(трифторацетил)пероксидом [23], электрофильным трифторметилированием индола трифторметилирующими агентами, являющимися производными гипервалентного йода [24], через [2-(*N*-фенилацетиламино)бензил]трифенилфосфония хлорид [25],

восстановительной циклизацией *N*-(2-бензоилфенил)трифторацетамида [26], через катализируемое палладием аннелирование (3,3,3-трифторпроп-1-инил)бензола [27,28], через этил 4,4,4-трифторбут-2-иноат и дифенилнитрон [29], через сочетание 2-галогентрифторацетанилидов с β -кетозэфирами [30], обработкой 2-иодиндолов $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ и CuI [31], а также реакцией Фишера через фенилгидразоны α -трифторметилкетонов [32–34]. Синтез трифторметилированных индолов имеет весьма большое значение в медицинской химии, т.к. хорошо известно, что представители этой группы соединений обладают антидиабетической активностью [35]. Более того, различные 3-(пиразолил)индолы, синтезированные ранее различными методами [36–63], проявляют широкий спектр биологической активности [50–64], а 4-(5-(индол-3-ил)-3-(трифторметил)пиразол-1-ил)бензолсульфонамид является самым мощным ингибитором PDK–киназы среди других исследованных 4-(5-гетарил-3-(трифторметил)пиразол-1-ил)бензолсульфонамидов [65,66].

Два подхода, описанных выше, позволяют получать некоторые CF_3 -индолы реакцией Фишера, используя в качестве катализатора либо MeSO_3H (в AcOH) [32], либо *p*- TsOH (в толуоле) [33,34], однако, когда мы попробовали использовать эти подходы для **11a**, чтобы получить соответствующий трифторметилированный 3-(пиразолил)индол, этот индол удалось обнаружить методами ^1H и ^{19}F ЯМР спектроскопии лишь в следовых количествах, тогда как **11b** в первых условиях [32] дал неожиданный продукт.

Мы обнаружили, что фенилгидразоны **11** и **12** могут быть превращены в первые представители 2-(трифторметил)-3-(пиразолил)индолов, региоизомерные соединения **13** и **14** с выходами 26–73% при нагревании в MeSO_3H в присутствии P_4O_{10} (15%). 3-(Пиразолил)индолы **14**, производные пиразол-5-карбоновой кислоты, были синтезированы двумя путями, через использование $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{AcOH}$ [32] и $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{P}_4\text{O}_{10}$ (Схема 7). Строение индолов **13** и **14** подтверждено методами ЯМР и ИК спектроскопии, а также элементным анализом. В спектрах ЯМР ^1H , записанных в $\text{DMSO}-d_6$, сигналы индольных протонов соответствовали таковым, наблюдаемым для других 2-(трифторметил)индолов [28, 32–34]. Пиразольный протон в производных 1-фенилпиразол-3-карбоновой кислоты **13** проявился в виде в несколько более сильном поле (δ 7.01–7.11), чем такой же протон в производных 1-фенилпиразол-5-карбоновой кислоты **14** (δ 7.16–7.24). В спектрах ЯМР ^{19}F ($\text{DMSO}-d_6$, C_6F_6) соединений **13** и **14** наблюдался сигнал при $\sim \delta$ 105–106, соответствующий трифторметильной группе, находящейся при индольном фрагменте [28]. В спектре ЯМР ^{13}C соединения **13b**, атомы C-2 и C-3 индольного кольца проявились в виде характеристических квартетов при δ 123.0 ($^2J_{\text{C,F}} = 36.7$ Гц) and 105.0 ($^3J_{\text{C,F}} = 2.8$ Гц).

Атом углерода трифторметильной группы проявился в виде квартета при δ 121.0 ($^1J_{C,F} = 269.7$ Гц).

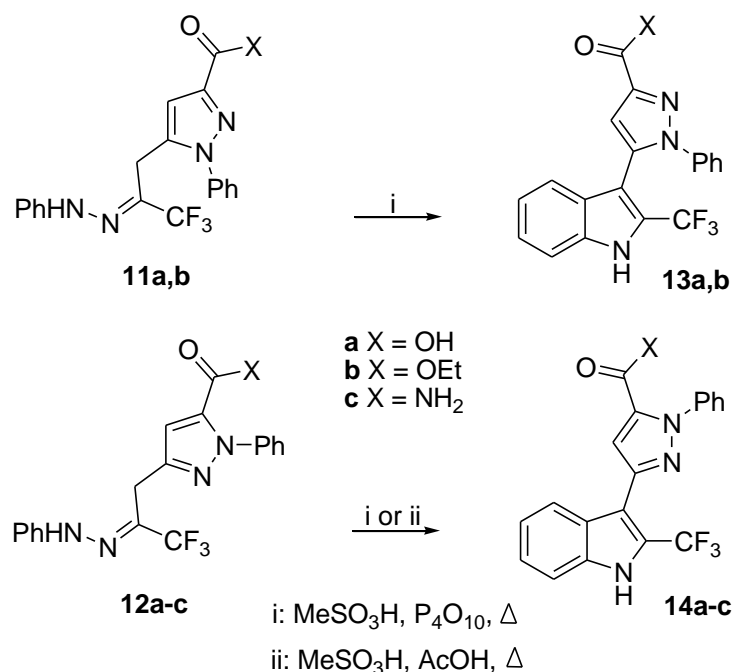


Схема 7.

Необычный индол был выделен с выходом 38%, после обработки фенилгидразона **11b** AcOH/MeSO₃H при нагревании. В отличие от **11a**, который в этих же условиях давал, хоть и в следовых количествах, ожидаемый индол **13a**, субстрат **11b** превращался в региоизомерный индол **18** (схема 8). Обнаруженная реакция выглядит как изомеризация индола **13b** вследствие обмена группами CF₃ и CO₂Et. На самом же деле, наиболее вероятный механизм реакции включает в себя рециклизацию протонированной формы **15** при атаке енгидразинной NH группой по положению **5** пиразольного кольца. Промежуточный спиропиразолин **16**, образующийся таким образом из **11b**, затем подвергается реакции раскрытия цикла в условиях протонной среды с образованием пиразол-фенилгидразона **17**, изомерного исходному соединению **11b**. Затем соединение **17** подвергается реакции Фишера с образованием 3-(пиразолил)индолы **18**. Несмотря на то, что **11a** структурно подобен **11b**, мы не смогли обнаружить индола типа **18** при обработке **11a** в аналогичных условиях.

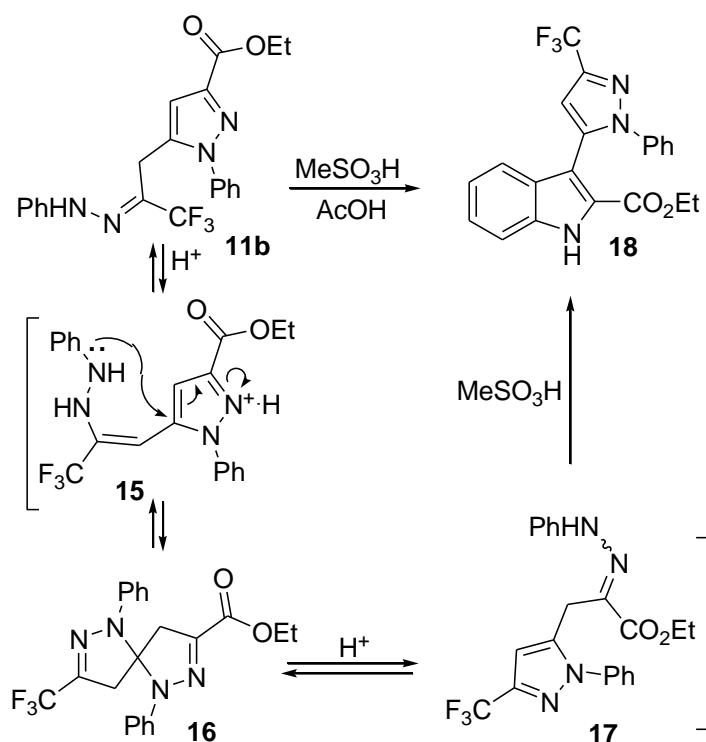


Схема 8.

Структура соединения **18** однозначно подтверждена спектральными методами. Синглет при δ 102.0 (по сравнению с δ 105.3–106.2 для 2- CF_3 -индолов **13** и **14**; см. таблицу 2), наблюдаемый в спектре ^{19}F ЯМР подтверждает тот факт, что трифторметильная группа находится в 3-м положении пиразольного кольца [67,68]. В спектре ЯМР ^{13}C соединения **18** наблюдаются характеристические квартеты атомов С-3 при δ 141.3 ($^2J_{\text{C,F}} = 37.6$ Гц) и С-4 при δ 107.6 ($^3J_{\text{C,F}} = 1.9$ Гц) пиразольного кольца. Квартет при δ 141.3 подтверждает, что трифторметильная группа присоединена к пиразольному кольцу (атом углерода, имеющий связь с трифторметильной группой в региоизомерном индоле **13b** проявлялся при δ 123.0. Трифторметильный углерод в **18** проявился в виде квартета при δ 121.6 ($^1J_{\text{C,F}} = 268.6$ Гц). 3-(Пиразолил)индолы, трифторметилированные по пиразольному кольцу, являются очень важной группой соединений, т.к. обладают свойствами ингибиторов циклооксигеназы (COX-1/COX-2) и липоксигеназы [69,70]. Таким образом, мы обнаружили, что производные 3-(2-(трифторметил)индол-3-ил)-1-фенилпиразол-5-карбоновой кислоты могут быть получены с использованием в качестве среды для проведения реакции Фишера либо $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{AcOH}$ [32], либо $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{P}_4\text{O}_{10}$, тогда как производные 5-(2-(трифторметил)индол-3-ил)-1-фенилпиразол-3-карбоновой кислоты могут быть синтезированы при использовании в качестве реакционной среды только $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{P}_4\text{O}_{10}$.

В литературе отсутствуют сведения о взаимодействии неаннелированных 2-трифторметил-4-пиронов с гидразином. Мы исследовали реакцию **2** с гидразином в различных условиях и обнаружили, что при использовании N_2H_4 в качестве свободного основания, образуется сложная смесь продуктов, тогда как использование $N_2H_4 \cdot 2HCl$ (2.2 экв) в воде, согласно данным ЯМР 1H спектроскопии, давал смесь региоизомерных пиразолов **19** и **20** (схема 9). Нерастворимый в воде изомер **19** был легко выделен из реакционной массы фильтрованием (выход 30%), а растворимы изомер **11** не был выделен, а сразу переведен в фенилгидразон **21** обработкой остатка, полученного при испарении воды из фильтрата, избытком гидрохлорида фенилгидразина (выход 30%). Аналогичным образом соединение **19** было переведено в соответствующий фенилгидразон **22** (выход 63%) обработкой избытком $PhNHNH_2 \cdot HCl$. Стабильная кетонная форма кетона **19** (согласно данным 1H ЯМР спектроскопии) может быть объяснена образованием прочной внутримолекулярной водородной связи (ВМВС) между енольной ОН группой и пиразольным атомом азота. В спектре ЯМР 1H соединения **19** наблюдаются синглеты винильного (δ 6.39) и пиразольного (δ 6.82). Подвижные протоны проявляются в виде уширенных синглетов при δ 9.55 и 13.30. В спектре ЯМР ^{19}F кетона **19**, трифторметильная группа проявляется в виде синглета при δ 101.5, подтверждая, что это соединение принадлежит к классу CF_3 -пиразолов [71,72]. Фенилгидразоны α -трифторметилкетонов, таких как **11**, **12** и **21** являются *E*-изомерами (CF_3 группа является более пространственно затрудненным заместителем, чем CH_2), и это явление было подтверждено ранее для фенилгидразонов других α -трифторметилкетонов, содержащих α' - CH_2 группу [34]. *E*-изомерная структура таких фенилгидразонов α -трифторметилкетонов была однозначна нами подтверждена с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) монокристалла фенилгидразона **12b** (рис. 3).

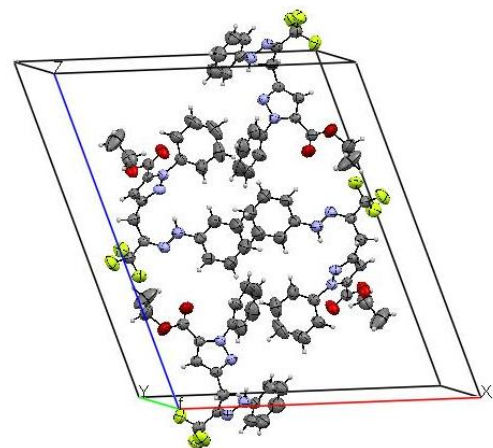
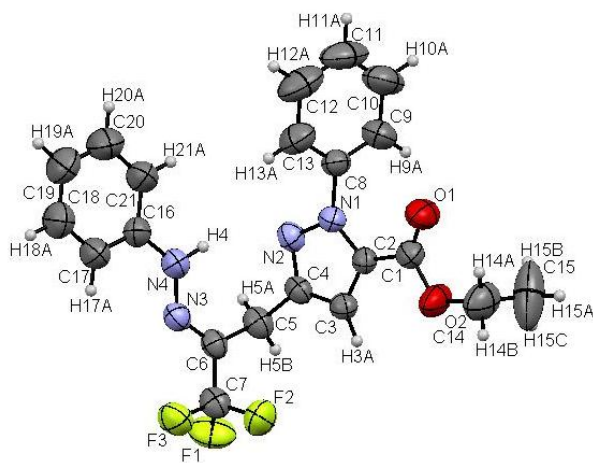


Рис. 3. Молекулярная структура **12b** и упаковка в кристалле (данные PCA, CCDC 822163).

Структура **12b** зарегистрирована в Кембриджском банке кристаллографических данных за номером CCDC 822163.

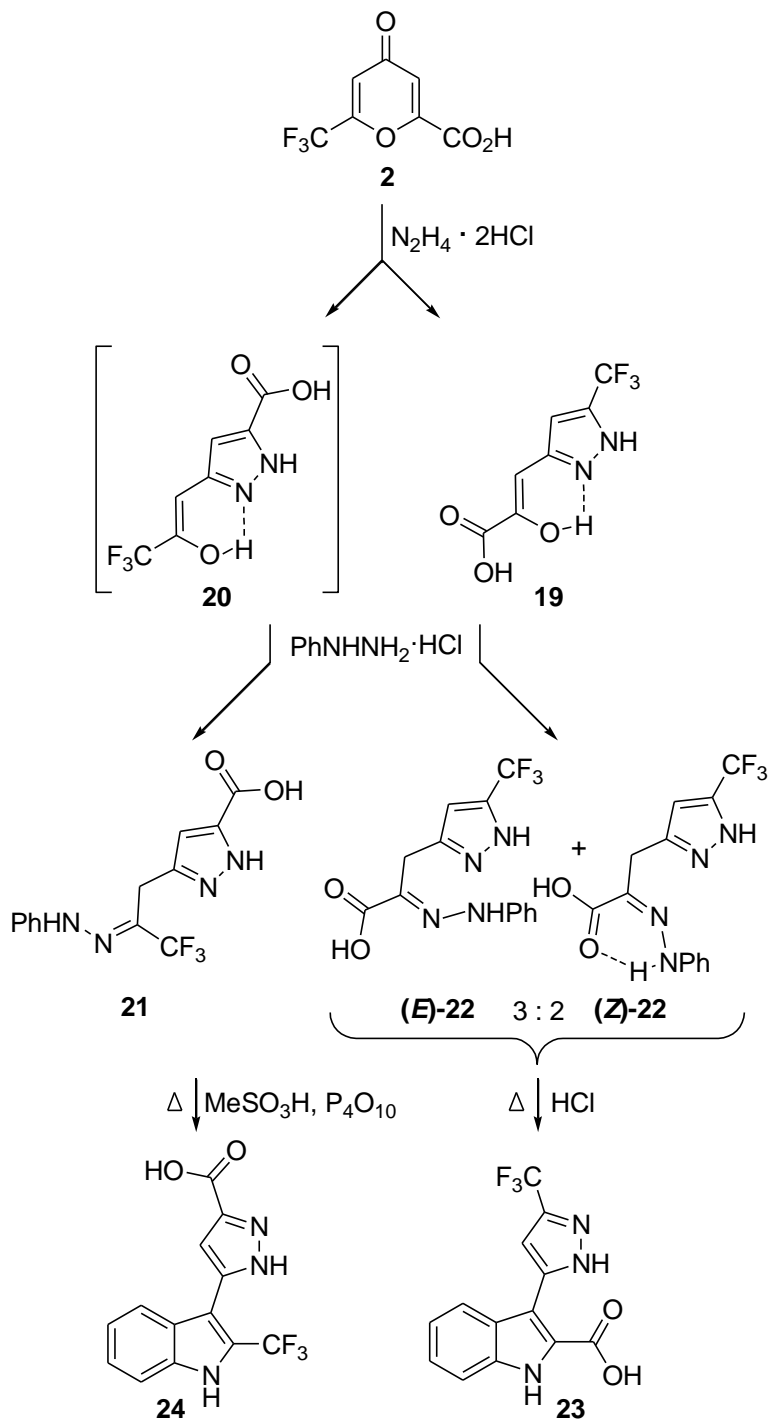


Схема 9.

В противоположность соединению **21**, фенилгидразон **22** представляет собой смесь *E*- и *Z*-изомеров (соотношение 3 : 2, данные ^1H ЯМР спектроскопии). Оба эти изомера были выделены из реакционной смеси в индивидуальном состоянии. Характеристический NH протон фенилгидразонного фрагмента основного изомера (*E*)-**22** проявился в виде синглета при δ 10.26, подтверждая *E*-изомерную структуру (почти такое же значение имеют фенилгидразоны **11** и **12** [13]). Значение, равное 10.26, показывает, что даже замещение CF_3 группы в фенилгидразонном фрагменте на группу CO_2H , почти не оказывает влияния на химический сдвиг NH протона. Метиленовые и пиразольный протоны в (*E*)-**22** проявились в виде синглетов при 4.05 и 6.26, соответственно. Минорный изомер (*Z*)-**22** представлен в спектре ЯМР ^1H синглетами метиленовых и пиразольного протонов при δ 3.84 и 6.44, соответственно, и исключительно слабопольным сигналом фенилгидразонного NH протона (δ 12.2), вследствие образования ВМВС между NH и $\text{C}=\text{O}$. Такой же слабопольный сигнал NH протона наблюдался в спектре структурно схожей дикарбоновой кислоты, содержащей в α -положении фенилгидразонный заместитель (δ 12.1) [13]. Так как соединения (*E*)-**22** and (*Z*)-**22** не являются фенилгидразонами какого-либо α -трифторметилкетона, они переходят в соответствующий индол в более мягких условиях. Нагревание смеси (*E*)-**22** and (*Z*)-**22** in EtOH в присутствии HCl дало 3-(3-(трифторметил)пиразол-5-ил)индол-2-карбоновую кислоту **23** с выходом 58%. Региоизомерный индол **24** не может быть получен из **21** обработкой EtOH–HCl, однако, обработка **21** смесью MeSO_3H и P_4O_{10} дала CF_3 -индол **24** с выходом 10%. Использование в качестве реакционной среды $\text{MeSO}_3\text{H}/\text{AcOH}$ не позволило получить **24** даже меньшим выходом. Структура региоизомерных индолов **23** и **24** подтверждена спектральными методами и элементным анализом. Таким образом, нами было показано, что последовательная обработка 6-(трифторметил)комановой кислоты как CF_3 -пирона фенилгидразином как бинуклеофилом, и, затем, фенилгидразином, и обработка образующихся интермедиатов в условиях реакции Фишера дает 3-(3-(трифторметил)-5-ил)индол-2-карбоновую кислоту **23** и региоизомерную 5-(2-(трифторметил)индол-3-ил)-1*H*-пиразол-3-карбоновую кислоту **24**.

Изученные выше реакции могут быть представлены как новый подход к региоселективному синтезу различных трифторметилированных 3-(гетарил)индолов на основе 2- CF_3 -4-пиранов. Использование в этом подходе других бинуклеофилов (вместо гидразина) могло бы привести к синтезу большого разнообразия новых CF_3 -индолов, функционализированных в 3-м положении различными гетероциклами.

Недавно мы описали простой синтез 2-(трифторметил)-4-пирана **25a** и -тиопирана **25b** из 6-(трифторметил)комановой кислоты **2** [73].

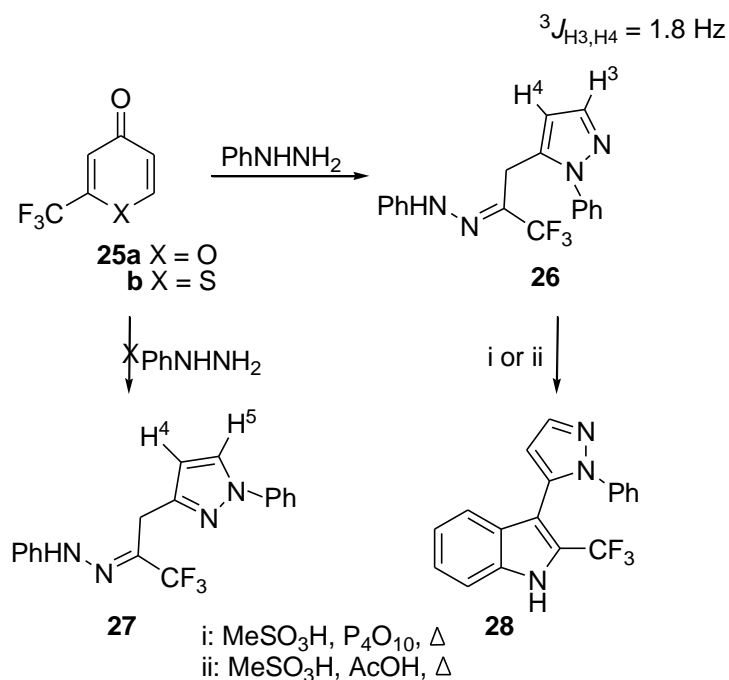


Схема 10.

Мы исследовали реакции **25** с фенилгидразином и обнаружили, что оба соединения, **25a** и **25b**, дают один и тот же продукт, фенилгидразон 1,1,1-трифтор-3-(1-фенилгидразоно-5-ил)пропан-2-она **26** с выходами 16–14% (схема 10). Региоизомерный продукт, 1,1,1-трифтор-3-(1-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)пропан-2-он **27** не был обнаружен в неперекристаллизованных образцах **26**. Соединения **26** и **27** могли бы быть легко распознаны при использовании в качестве индикатора значений вицинальных констант спин-спинового взаимодействия между Н³–Н⁴ и Н⁴–Н⁵ в спектрах ЯМР ¹Н. Согласно литературным данным, в случае **26** значение ³J_{H3,H4} должно составлять 1.6–2.0 Гц, тогда как для **27** оно должно быть около 2.5 Гц [36,37]. Наблюдаемое значение, равное 1.8 Гц однозначно доказывает структуру **26**. Нагревание соединения **26** в MeSO₃H в присутствии P₄O₁₀ привело к образованию 3-(1-фенилпиразол-5-ил)-2-(трифторметил)индола **28**, который был выделен с выходом 65%. Эта же реакция, проводимая в среде MeSO₃H/AcOH дала **28** с выходом 65%. В спектрах ЯМР ¹Н индола **28** трифторметильная группа проявилась в виде синглета при, подтверждая 2-CF₃-индольную структуру.

Результаты синтеза всех синтезированных трифторметилированных соединений, как и их значения δ_F приведены в таблице 2. ЯМР ¹⁹F спектроскопия оказалась хорошим методом для определения региохимии CF₃-3-(пиразолил)индолов. Табличные данные показывают, что атомы фтора трифторметильной группы во 2-м положении 3-(пиразолил)индолов принимают значения химических сдвигов около δ 105–106. В случае исходных региоизомерных фенилгидразонов, значения δ_F для **11** примерно такие же, как и

для **12** (96.7 и 96.6, соответственно), тогда как значение $\Delta\delta_F$ между соответствующими региоизомерными индолами **13** и **14** достигает 0.9 (105.3 и 106.2, соответственно).

Таким образом, мы разработали региоконтролируемый подход к синтезу трифторметилированных индолов на основе 6-(трифторметил)комановой кислоты, которые имеют большое значение для медицинской химии, для создания новых лекарственных средств, и для исследования процессов ксенобиотического метаболизма.

Таблица 2. Трифторметилированные производные пиразола и индола

п/п	Реагент	Продукт	Выход %	Т.пл. °C	δ_F ppm (DMCO- <i>d</i> ₆ , C ₆ F ₆)
1	2	11a	64	230–232	96.7
2	1	11b	43	199–200	96.7
3	2	12a	30	222–223	96.6
4	1	12b	34	106	96.6
5	10	12c	19	201–203	96.6
6	11a	13a	45 ^a	242–243	105.3
7	11b	13b	26 ^a	205–206	105.3
8	12a	14a	73 ^a , 46 ^b	240–241	106.2
9	12b	14b	65 ^a , 71 ^b	148–149	106.2
10	12c	14c	60 ^{a,b}	207–208	106.2
11	11b	18	38 ^b	182–183	102.0
12	2	19	30	231–232	101.5
13	2	21	30	171–172	96.5
14	2	22	80	170–190	102.2, 102.3
15	2	(<i>E</i>)- 22	37	196–197	102.2
16	2	(<i>Z</i>)- 22	28	172–173	102.3
17	22	23	58 ^c	256–257	102.6
18	21	24	10 ^a	222–224	106.2
19	25a,b	26	16 ^d , 14 ^e	166–167	96.7
20	26	28	60 ^a , 65 ^b	192–193	105.3

^aРеакцию проводили в MeSO₃H/P₄O₁₀.

^bРеакцию проводили в AcOH/MeSO₃H.

^cРеакцию проводили в EtOH/HCl.

^dПолучен из **25a**.

^eПолучен из **25b**.

1.3.2.1.2.2. Региоселективный синтез 2- и 5-трифторметилпиразоло[1,5-*c*]пиримидинов на основе 7,7,7-трифтор-2,4,6-триоксогептановой и 6-(трифторметил)комановой кислот

Пиразоло- и триазоло[1,5-*c*]пиримидины обладают широким спектром биологической активности [74–76], что стимулирует разработку новых методов их получения. Большинство описанных ранее синтезов пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов основано на использовании полиэлектрофильных субстратов в реакциях с производными семикарбазида. При получении различных представителей этого класса конденсированных гетероциклов в качестве исходных веществ применяли 4-пироны [76], 1,3,5-трикетоны [77], аминали пиразолил(этоксикарбонил)кетена [78], дифторборные хелаты ароилацетонов [79], а также соли 2,4,6-трифенилпирилия [79–80]. Однако, несмотря на широкое разнообразие заместителей [82–84], синтез трифторметилированных производных пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов до сих пор не описан.

Недавно нами было показано [84], что реакция 6-трифторметилкомановой кислоты с фенилгидразином в зависимости от природы растворителя ведет к получению 5-[3,3,3-трифтор-2-(фенилгидразано)пропил]-1-фенил-1*H*-пиразол-3-карбоновой кислоты (в воде) или 1-фенил-3-[3,3,3-трифтор-2-(2-фенилгидразано)пропил]-1*H*-пиразол-5-карбоновой кислоты (в диоксане). В продолжение наших работ по региоселективному синтезу гетероциклов на основе различных производных комановой кислоты [85–87] мы изучили взаимодействие аминогуанидина и тиосемикарбазида с 6-три(ди)фторметилкомановыми кислотами и их прекурсорами – этил 7,7,7-трифтор- и 7,7-дифтор-2,4,6-триоксогептаноатами, что позволило разработать региоконтролируемый подход к 2- и 5-трифторметилпиразоло[1,5-*c*]пиримидинам.

Известно [87,88], что сернокислотный гидролиз динатрий трикетонатов **29a,b**, полученных конденсацией этил 2,4-диоксопентаноата с $R^F\text{CO}_2\text{Et}$ ($R^F = \text{CF}_3, \text{CF}_2\text{H}$) в

присутствии этилата натрия, сопровождается циклодегидратацией и дает этил 6- R^F -команоаты **1** и **30** с выходами 47 и 52% соответственно. Мы нашли, что если гидролиз трикетонатов **29a,b** проводить в более мягких условиях (HCO_2H , ТГФ, 0 °C), то реакцию удастся остановить на стадии образования этил 7,7,7-трифтор-2,4,6-триоксогептаноата **31a** (25%) и этил 7,7-дифторметил-2,4,6-триоксогептаноата **31b** (47%). Триоксоэфиры **31a,b** представляют собой бесцветные кристаллические вещества и могут оказаться полезными для медицинской химии, поскольку описанные ранее нефторированные производные этого класса соединений обладают свойствами ингибиторов ВИЧ-интегразы [89–91]. При хранении при комнатной температуре в течение нескольких месяцев они самопроизвольно циклизируются с потерей молекулы воды в пироны **1** и **30** (схема 11).

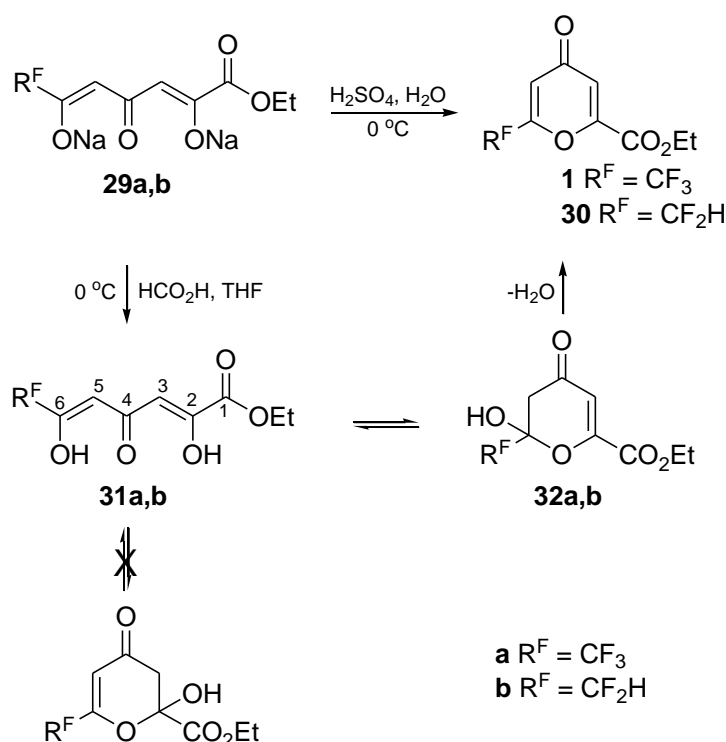


Схема 11.

По данным ЯМР ^1H спектров соединения **31** находятся в растворе в виде смеси двух кольчато-цепных таутомеров – открытой диенольной формы **31** и циклической дигидропирановой формы **32**. Так, триоксоэфир **3a** существует в виде смеси состава **31a** : **32a** = 82 : 18 в CDCl_3 и **31a** : **32a** = 4 : 96 в DMSO-d_6 . В спектре ЯМР ^1H этого соединения,

записанного в CDCl_3 , наблюдаются два набора сигналов, при этом открытоцепной таутомер **31a**, помимо сигналов протонов этильной группы, представлен синглетами протонов H(5) (δ 5.99 м.д.) и H(3) (δ 6.34 м.д.), а также уширенным синглетом двух енольных OH-групп в области слабого поля (δ 12.0–14.0 м.д.). Слабополюный сигнал с максимумом при $\delta \sim 13.0$ м.д. свидетельствует о том, что оба подвижных протона участвуют в образовании прочной внутримолекулярной водородной связи (ВМВС), подтверждая тем самым (Z,Z)-конфигурацию соединения **31a**. Циклическая форма **32a** представлена характерной АВ-системой протонов метиленовой группы (δ 5.92 м.д., $J = 17.0$ Гц), синглетом протона полуацетальной OH-группы (δ 4.35 м.д.) и синглетом винильного протона (δ 6.40 м.д.). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , C_6F_6), в котором наблюдались синглеты CF_3 -групп при δ 87.0 м.д. (**31a**) и δ 76.0 м.д. (**32a**), согласуется с наблюдаемым в спектре ЯМР ^1H соотношением таутомеров, а смещение сигнала CF_3 -группы при переходе от **31a** к **32a** в более сильное поле на $\Delta\delta$ 11.0 м.д. подтверждает тот факт, что циклизация протекает по карбонилу, связанному с CF_3 -группой. В спектре ЯМР ^1H , снятом в DMCO-d_6 , присутствует синглет винильного протона при δ 6.24 м.д. и два дублета метиленовых протонов (δ 2.73 и 3.26 м.д., $J_{\text{AB}} = 16.6$ Гц). Аналогичное влияние растворителя было обнаружено и для триоксоэфира **31b**. В этом случае в растворе в CDCl_3 присутствовал в основном открытоцепной таутомер (90%), тогда как в DMCO-d_6 – исключительно циклическая форма **32b**. В спектре ЯМР ^{19}F (CDCl_3) соединения **32b** дифторметильная группа основного (линейного) таутомера проявляется в виде дублета (δ 35.2 м.д., $^2J_{\text{H,F}} = 54$ Гц), а циклического – в виде двух дублетов дублетов неэквивалентных атомов фтора ($\delta_{\text{F}^1} 25.6$ м.д., $\delta_{\text{F}^2} 29.1$ м.д., $^2J_{\text{F,F}} = 290.2$ Гц, $^2J_{\text{H,F}} = 55.3$ Гц). Наблюдаемое смещение таутомерного равновесия в сторону дигидропионовой структуры **32** при переходе от CDCl_3 к DMCO-d_6 можно объяснить ее большей полярностью, а также дестабилизирующим влиянием DMCO-d_6 на устойчивость открытого таутомера **31** из-за разрыва ВМВС; возникающая при этом межмолекулярная водородная связь между

полукетальной ОН-группой и атомом кислорода молекулы ДМСО- d_6 способна дополнительно стабилизировать циклическую форму **32**. В твердом состоянии триоксоэфиры находятся в полностью енолизированной форме **31**, о чем свидетельствует присутствие в ИК-спектрах (НПВО) низкочастотной полосы поглощения сопряженной карбонильной группы при $\nu_{C=O}$ 1618 см^{-1} для **32a** и 1616 см^{-1} для **32b** (полоса сложноэфирного карбонила наблюдается при $\nu_{C=O}$ 1736–1747 см^{-1}). Наши выводы о строении триоксоэфиров **31a,b** в твердом виде и в растворах хорошо согласуются со строением 6-фенил-2,4,6-триоксогексановой кислоты [91]. В кристаллическом состоянии эта кислота находится в диенольной форме, которая преобладает и в растворе ацетона- d_6 (86%), а в ДМСО- d_6 – в виде смеси циклического таутомера (52%) с диенолом (42%) и моноенолом (65%) [91].

Полученные нами триоксоэфиры **3**, являясь по сути гидратированными производными команоатов **1** и **30**, и их синтетическими эквивалентами с тем же числом электрофильных центров, представляют интерес для региоконтролируемого синтеза фторсодержащих конденсированных гетероциклов, что может быть достигнуто при использовании соединений **1**, **30** и **31** в реакциях с полинуклеофилами, например, с аминогуанидином, способным взаимодействовать сразу по трем электрофильным центрам субстрата (атомы С-2, С-4 и С-6). Синтез пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов имеет большое значение для создания новых лекарственных средств, так как эти гетероциклы обладают гипнотической, седативной и антимикробной активностью [77,93], а также интересны в качестве препаратов, подавляющих пролиферацию раковых клеток и ингибирующих протеинкиназы [76]. Учитывая важную роль пиразоло[1,5-*c*]пиримидиновой системы в медицинской химии, мы изучили возможность использования пиранов **1**, **30** и триоксоэфиров **31** в синтезе фторсодержащих представителей этого класса соединений, которые ранее не были описаны.

Нами найдено, что этил 6- CF_3 -команоат **1** и легко образующаяся из него 6- CF_3 -комановая кислота **33** [87] взаимодействуют с гидроклоридом амингуанидина при нагревании в этаноле, в результате чего были выделены этил 7-амино-5-трифторметилпиразоло[1,5-*c*]пиримидин-2-карбоксилат **34a** (17%) и соответствующая кислота **34c** (65%), причем в обоих случаях региоизомерные продукты **35a,c** обнаружены не были. Интересно, что триоксоэфир **31a** реагировал с бикарбонатом амингуанидина иначе, давая этил 7-амино-2-трифторметилпиразоло[1,5-*c*]пиримидин-5-карбоксилат **35a** (15%). Следует отметить, что неперекристаллизованный образец **35a** содержал в качестве примеси региоизомер **34a**, но в количестве всего 3% (схема 12).

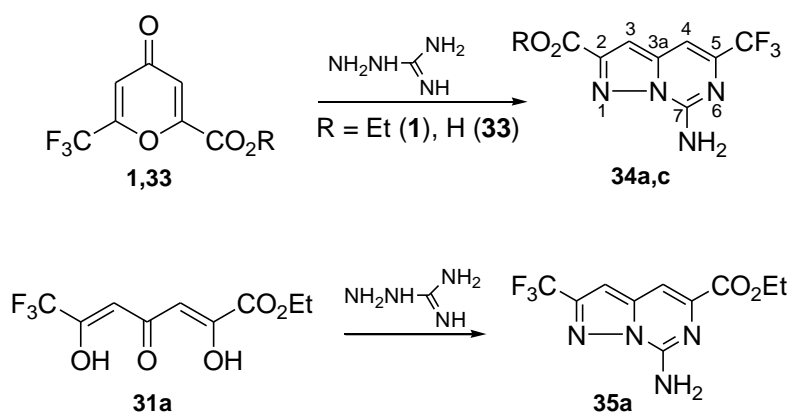


Схема 12.

Строение полученных продуктов подтверждено данными элементного анализа, ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F и ИК-спектроскопии. В спектре ЯМР ^1H (DMSO-d_6) пиразолопиримидина **34a** помимо сигналов этильной группы наблюдаются синглеты пиразольного (δ 7.18 м.д.) и пиримидинового протонов (δ 7.51 м.д.), а также уширенный синглет NH_2 -группы при δ 8.3 м.д. В спектре ЯМР ^{19}F трифторметильная группа проявляется в виде синглета при δ 94.8 м.д., а в спектре ЯМР ^{13}C присутствуют три квартета (δ 121.7 м.д., CF_3 , $^1J_{\text{C,F}} = 273.0$ Гц; 137.2 м.д., C(5), $^2J_{\text{C,F}} = 34.4$ Гц; 99.8 м.д., C(4), $^3J_{\text{C,F}} = 4.1$ Гц). Данные рентгеноструктурного анализа **34a** (рис. 4) однозначно доказывают региохимию реакции.

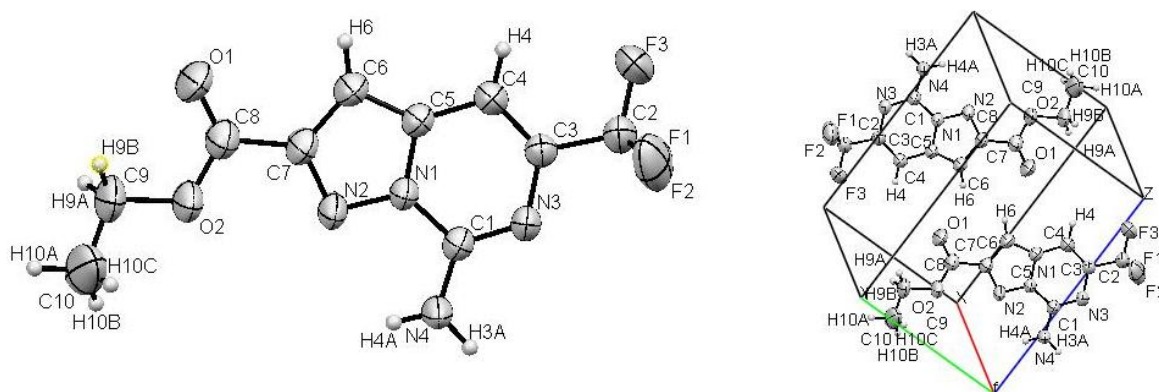


Рис. 4. Структура пиразолопиримидина **34a** (данные PCA). Детали рентгеноструктурного исследования приведены в Кембриджском центре структурных данных (CCDC 819529).

Как и в случае с **33**, 6-дифторметилкомановая кислота **36** [88] реагировала с аминогуанидином региоселективно, давая почти исключительно пиразолопиримидин **34d** (50%), в то время как реакции дифторметилированных соединений **30** и **31b** с этим же нуклеофилом привели к получению смесей региоизомерных продуктов (**34b** : **35b** = 3 : 2 и **34b** : **35b** = 2 : 3 соответственно, выходы 17–22%) (схема 13).

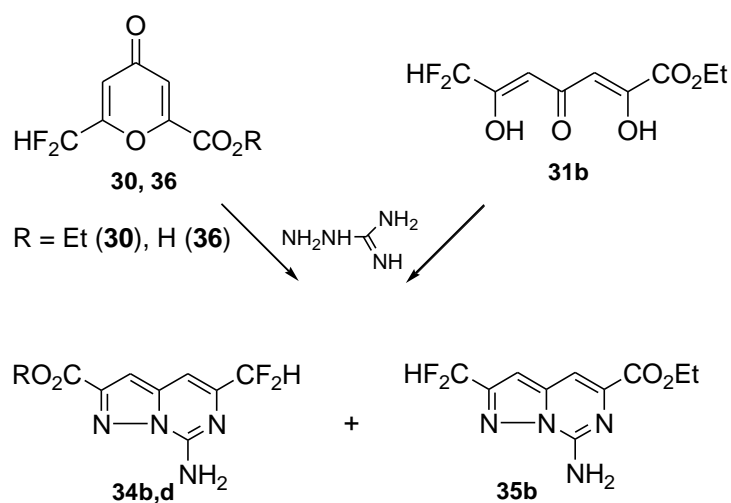


Схема 13.

Наблюдаемое различие в реакционной способности соединений **1**, **30** и **31** связано, по-видимому, с тем, что первоначальная нуклеофильная атака пиранов **1**, **30** под действием NH_2 -группы гидразинного фрагмента аминогуанидина протекает по атому C(2), что ранее наблюдалось на примере взаимодействия этих соединений с фенилгидразином [84], тогда как в случае триоксоэфиров **31** более предпочтительной оказывается атака по атому C(6). При переходе от **31a** к **31b** электрофильность атома C(6) снижается вследствие меньших электроноакцепторных свойств CF_2H -группы по сравнению с CF_3 -группой и вероятность первоначальной атаки по атому C(2) увеличивается, что ведет к снижению региоселективности и появлению существенного количества изомера **34b**.

Строение пиразолопиримидинов **35a,b** подтверждено элементным анализом и спектральными данными. В спектре ЯМР ^1H соединения **35a** сигнал пиримидинового протона находится в более слабом поле (δ 7.76 м.д.) по сравнению с сигналом того же протона в изомере **34a** (δ 7.51 м.д.), что связано с большим дезэкранирующим эффектом заместителя CO_2Et по сравнению с CF_3 -группой. В спектре ЯМР ^{13}C соединения **35a**, как и в случае **34a**, наблюдаются три квартета: δ 120.8 м.д. (CF_3 , $^1J_{\text{C,F}} = 270.0$ Гц), δ 146.6 м.д. (C(2), $^2J_{\text{C,F}} = 38.5$ Гц), δ 99.0 м.д. (C(3), $^3J_{\text{C,F}} = 2.2$ Гц). При этом сигнал с $^2J_{\text{C,F}} = 38.5$ Гц находится в значительно более слабом поле ($\Delta\delta$ 9.4 м.д.), чем соответствующий сигнал для **34a** (δ 137.2 м.д.), что связано с дезэкранирующим эффектом фрагмента $\text{C}=\text{N}$ пиразольного кольца и согласуется с приписываемой структурой.

Тиосемикарбазид, *S*-аналог аминогуанидина, реагировал с пиранами **1**, **30** и триоксоэфирами **31** менее однозначно, давая, как правило, сложные смеси продуктов. Тем не менее, среди исследованных превращений с участием тиосемикарбазида, после тщательного подбора условий, наиболее удачными оказались реакции соединений **1** и **31a** с этим полинуклеофилом. В первом случае в качестве продукта реакции с низким выходом (13%) был выделен этил 7-тиоксо-2-трифторметил-6,7-дигидропиразоло[1,5-*c*]пиримидин-5-карбоксилат **36**, тогда как во втором случае, при использовании в качестве

электрофильного субстрата триоксоэфира **31a**, атаке гидразинным фрагментом молекулы тиосемикарбазида подвергались атомы C(4) и C(6), в результате чего с выходом 39% был получен пиразолин **37** (схема 14).

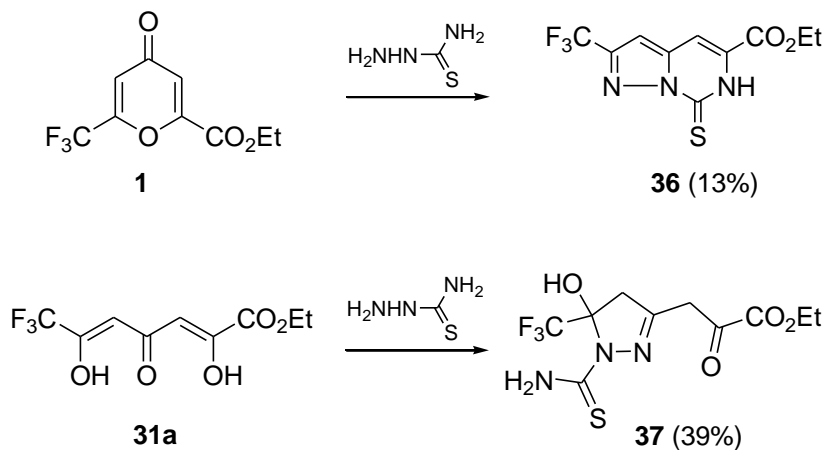


Схема 14.

Соединение **36** относится к ряду 2- CF_3 -пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов, так как в спектре ЯМР ^{13}C химические сдвиги углерода CF_3 -группы, а также атомов C(2) и C(3), почти совпали с таковыми для 2- CF_3 -пиразолопиримидина **35a**. Наличие тионной группы в этом продукте подтверждается как данными ИК-спектра, в котором наблюдается характерная полоса поглощения в области ν 1095–1110 cm^{-1} ($\text{C}=\text{S}$) [82], так и данными ЯМР ^{13}C спектроскопии. Так, в спектре соединения **36** сигнал углерода C(5) (δ 129.6 м.д.) смещен в более сильное поле на $\Delta\delta$ 12.2 м.д., а C(7) (δ 159.8 м.д.) – в более слабое поле на $\Delta\delta$ 12.8 м.д. по отношению к соответствующим сигналам углеродных атомов в соединении **35a** (δ 141.8 (C5) и 147.0 м.д. (C7)), что свидетельствует о наиболее существенных изменениях в химическом окружении при переходе от **35a** к **36** именно при атомах C(5) и C(7). Преимущественное существование пиразоло[1,5-*c*]пиримидина **36** в тионной таутомерной форме следует из литературных данных [82,83], согласно которым различные 2,5-дизамещенные 7-меркаптопиразоло[1,5-*c*]пиримидины представлены в основном тионной структурой. В спектре ЯМР ^{19}F соединения **36** CF_3 -группа проявляется в виде синглета

при δ 101.2 м.д., что служит дополнительным подтверждением в пользу 2-CF₃-пиразолопиримидинового ряда.

Строение пиразолина **37** подтверждено данными элементного анализа, ЯМР ¹H, ¹⁹F, ¹³C и ИК-спектроскопии. В спектре ЯМР ¹H этого соединения наблюдаются две АВ-системы с центрами при δ 3.02 и 3.48 м.д. ($J_{AB} = 17.6, 19.6$ Гц) и сигналы протонов NH₂-группы, представленные синглетами при δ 9.54 и 10.32 м.д. В спектре ЯМР ¹³C помимо слабопольных сигналов тионного и карбонильных углеродных атомов наблюдаются синглеты метиленовых групп при δ 37.4, 46.8 и 61.0 м.д. Пиразолиновый атом C(3) проявляется в виде синглета при δ 148.6 м.д., тогда как C(5) – в виде квартета при δ 79.2 м.д. ($^2J_{C,F} = 31.6$ Гц), а CF₃-группа – в виде квартета при δ 122.7 м.д. ($^1J_{C,F} = 286.9$ Гц). Синглет при δ 79.1 м.д. в спектре ЯМР ¹⁹F свидетельствует о том, что CF₃-группа связана с sp³-гибридным атомом углерода, и тем самым дополнительно подтверждает правильность предложенной структуры **37**.

Спектроскопия ЯМР ¹⁹F может стать хорошим методом для определения принадлежности пиразоло[1,5-с]пиримидинов к ряду 2-R^F или 5-R^F производных. В соответствии с данными табл. 3 значения δ_F для 5-R^F-пиразоло[1,5-с]пиримидинов **34** примерно на 4.5 м.д. меньше, чем для соответствующих 2-R^F-пиразоло[1,5-с]пиримидинов **35**, независимо от числа атомов фтора в R^F-группе. Результаты синтезов и данные ЯМР ¹⁹F спектроскопии всех полученных соединений приведены в таблице 3.

Таким образом, нами впервые синтезированы тетракарбонильные синтетические эквиваленты этил 6-три(ди)фторметилкоманоатов, этил 7,7,7-трифтор-2,4,6-триоксогептаноат и этил 7,7-дифтор-2,4,6-триоксогептаноат, и показано различие в регионаправленности взаимодействия этих соединений с амингуанидином и тиосемикарбазидом по сравнению с соответствующими производными комановой кислоты.

Таблица 3.

Соединение	Выход (%)	Т.пл. (°C)	δ_F , м.д. (растворитель)
31a	25	89–90	92.5/78.7* (ДМСО- d_6) 87.0/76.0* (CDCl ₃)
31b	47	87–88	27.3*, 31.2* (2F) (ДМСО- d_6) 35.2/25.6*, 29.1* (2F) (CDCl ₃)
34a	17	142	94.8 (ДМСО- d_6)
34b	17**	186–188**	45.1 (ДМСО- d_6)
34c	65	275 (возг.)	94.8 (ДМСО- d_6)
34d	50	306–308 (возг.)	45.2 (ДМСО- d_6)
35a	15	202–203	99.3 (CDCl ₃)
35b	22***	200–201***	49.6 (ДМСО- d_6)
36	13	170–171	101.2 (ДМСО- d_6)
37	39	240–250 (возг.)	79.1 (ДМСО- d_6)

*Значение δ_F для циклического таутомера **32**

Приводятся данные для смеси региоизомеров **34b : **35b** (3 : 2), полученной из **30**.

***Приводятся данные для смеси региоизомеров **34b** : **35b** (2 : 3), полученной из **31b**.

1.3.2.1.3. Исследование структурных изменений в растениях под действием ЭТК.

Влияние на специализированные структуры накопления вторичных метаболитов.

В зависимости от природы метаболита, растение может по-разному изолировать его: выделять в окружающую среду через листья (характерно для летучих метаболитов), через корни (отложения корневых экссудатов), удерживать в вакуолях внутри клеток, выводить вместе с водой через устьица, а также собирать в специализированные структуры (идиобласты). Нами были выполнены исследования ЭТК на молодых растениях из семейства злаковых: пырейнике сибирском, овсянице красной, овсянице сизой, овсянице ложнодалматской, мятлике луговом, мятлике альпийском и мятлике баденском. В группы растений в форме водных культур (28 дней от начала всходов) вносили по 25 мл 0.05% раствора ЭТК, заменяя тем самым питательную среду, раствором ксенобиотика. Через 2 дня добавили еще по 20 мл 0.05% раствора ЭТК. Одновременно выращивались контрольные образцы растений этих же видов, в отсутствии ксенобиотика. На 6-й день с момента погружения корневой системы в раствор ЭТК растения извлекали из раствора, промывали дистиллированной водой и разделяли на 3 части: корешки, нижнюю часть листа и верхнюю часть листа. Микроскопические исследования проводили для растений, обработанных ЭТК (+ЭТК), в сравнении с контрольными образцами (контроль). Изучали особенности строения верхней части листа (верхний и нижний эпидермис), нижней части

листа и корешки (в т.ч. корневые волоски). Для удобства, использовали обозначение микрофотографий (рисунков) в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Обозначение микрофотографий различных частей растений.

Растение	Обозначение вида	ад.*		аб.**		кс.* [#]		нч. ^{##}		к. ^{#*}	
		контр оль	+ЭТК	контр оль	+ЭТК	контр оль	+ЭТК	контр оль	+ЭТК	контр оль	+ЭТК
Пырейник сибирский	1	а	b	с	d	е	f	g	h	i	j
Овсяница красная	2										
Овсяница ложнодалматская	3										

*ад. – адаксиальная сторона верхней части листа;

**аб. – абаксиальная сторона верхней части листа;

*[#]кс. – косой срез верхней части листа;

^{##}нч. – нижняя часть листа;

^{#*}к. – корень.

Микрофотографии получены на оптическом микроскопе Olympus BX-51 в прямом и отраженном свете. Линейное увеличение 1x500 и 1x1000. На адаксиальной части листьев пырейника сибирского (рис. 1a, 1a1) контрольных образцов (полученных без добавления ЭТК) хорошо видны устьица длиной ~40 мкм и шириной 13–15 мкм. При добавлении в качестве ксенобиотика ЭТК значительно увеличивается толщина замыкающих клеток устьиц, в результате чего ширина устьиц достигает 18–20 мкм (рис. 1b, 1b1). Длина устьиц также увеличилась до ~50 мкм. Существенных изменений на поверхности абаксиальной части листа пырейника сибирского при добавлении ЭТК не обнаружено. В контрольных образцах (рис. 1c), как и в образцах, выращенных в ксенобиотической среде (рис. 1d) нижняя эпидерма представляла собой тесно сомкнутые паренхимные клетки с ровными очертаниями. Микрофотографии косого среза верхней части листа пырейника сибирского показали различие в содержании пластид. Так, в контрольных образцах, помимо хлоропластов, наблюдалось значительное количество хромопластов (рис. e1), тогда как в образцах, выращенных в среде ЭТК, соотношение пластид смещалось в сторону

увеличения числа хлоропластов (рис. 1f). По-видимому, ЭТК усиливает процесс перехода лейкопластов в хлоропласты. Это предположение подтверждают также микрофотографии нижней части листа пырейника сибирского. В отсутствие воздействия ксенобиотика в верхних клеточных слоях нижней части листа хлоропласты наблюдаются в незначительных количествах (рис. 1g, 1g1), тогда как воздействие ЭТК позволяет обнаружить эти пластиды в существенных количествах (рис. 1h). Воздействие ЭТК на развитие листьев овсяницы красной отличается от такового в случае пырейника сибирского. Присутствие в среде ЭТК оказывает существенное влияние на развитие и состояние устьиц на адаксиальной стороне листа этого вида. Если в контрольных образцах длина устьиц составляла ~50 мкм (рис. 2a, 2a1), то в образцах, обработанных ксенобиотиком, значение едва достигало 40 мкм (рис. 2b, 2b1). Как и в случае пырейника сибирского, воздействие ЭТК на овсяницу красную сопровождалось увеличением содержания в листьях хлоропластов (рис. 2c по сравнению с рис. 2f и 2f1). В нижней части листа обнаруживаются развитые идиобласты (рис. 2h1, 2h3 – увеличение 1x500 и рис. 2h4 – увеличение 1x1000) в форме сосудов, внутри которых видны структуры нитевидной и сферической формы. Влияние ЭТК на мятлик альпийский отразилось как на увеличении размера устьиц (рис. 3a, 3a1, 3a2 – контроль, рис. 3b, 3b1 – образцы, выращенные в ксенобиотической среде), так и на образовании в листьях структур яйцевидной формы длиной 15–20 мкм (рис. 3f). Таким образом, ЭТК влияет как на структуру растений, приводя к образованию развитых идиобластов и включений, так и на работу замыкающих клеток устьиц.

Микрофотографии к разделу 1.2.2.1.3.

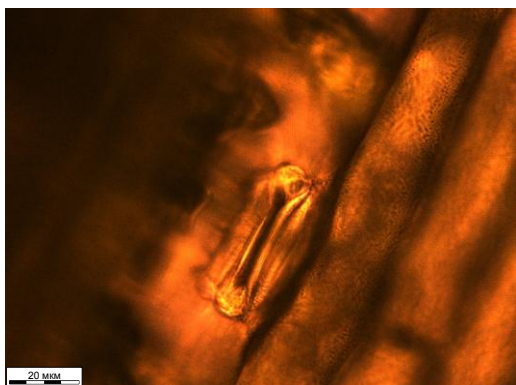


Рис. 1а.

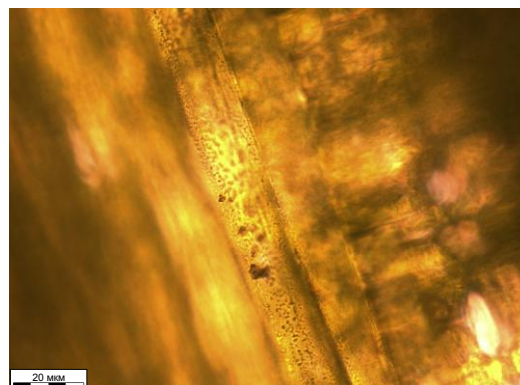


Рис. 1с.

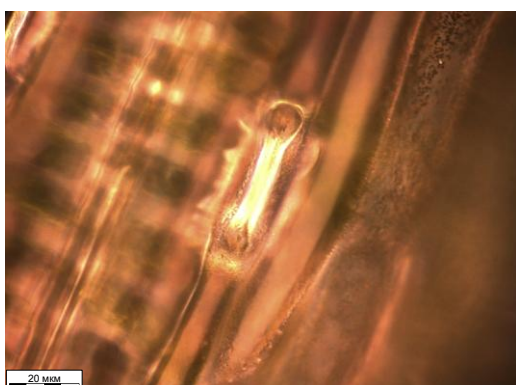


Рис. 1а1.

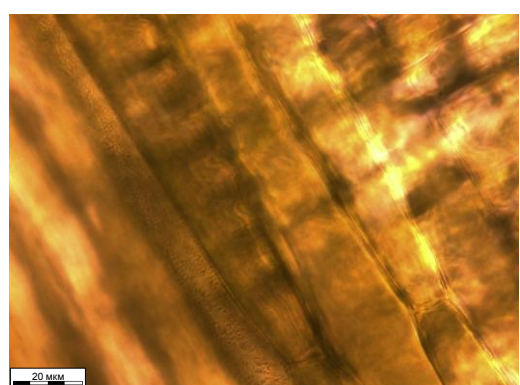


Рис. 1d.

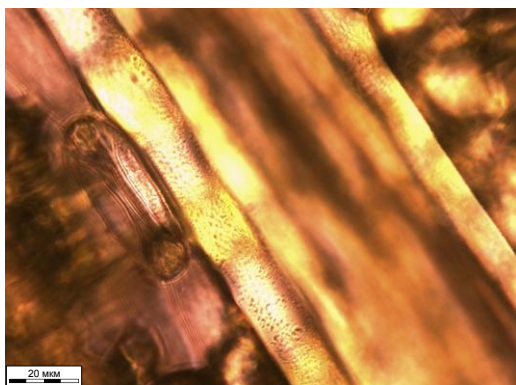


Рис. 1b.

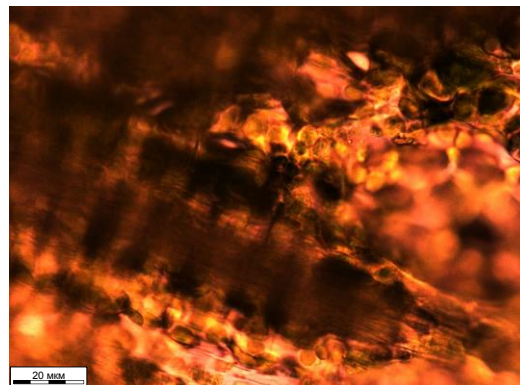


Рис. 1е.

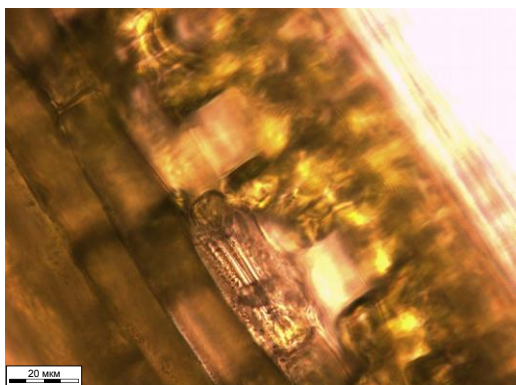


Рис. 1b1

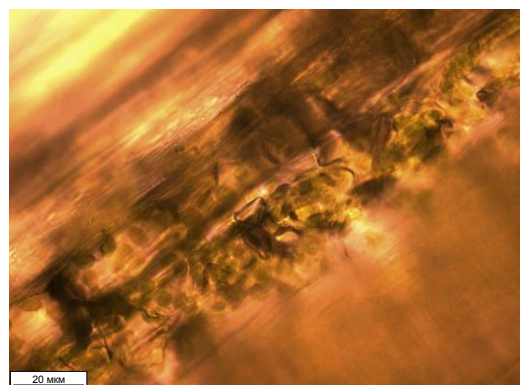


Рис. 1f.

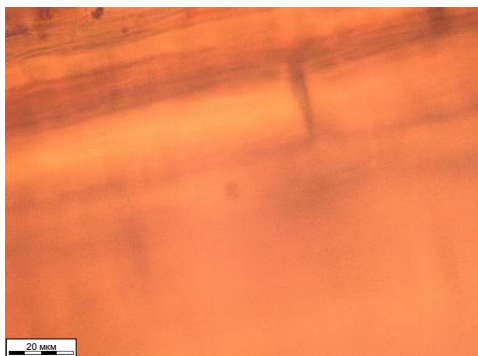


Рис. 1g.

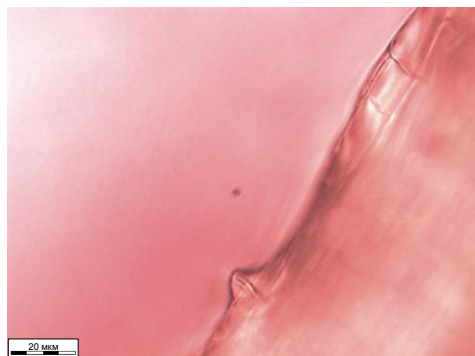


Рис. 1i.

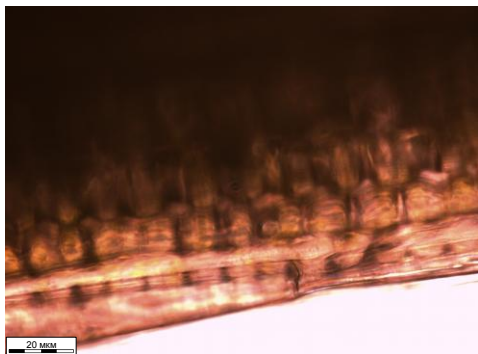


Рис. 1g1.

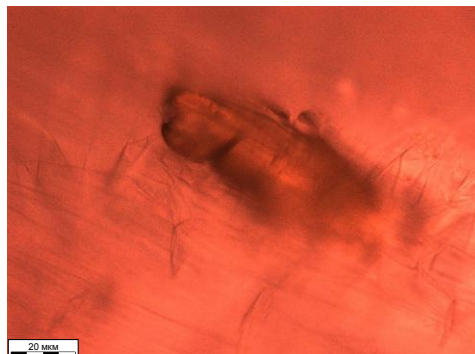


Рис. 1j.

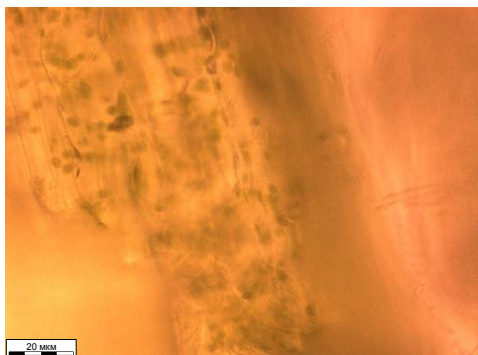


Рис. 1h.

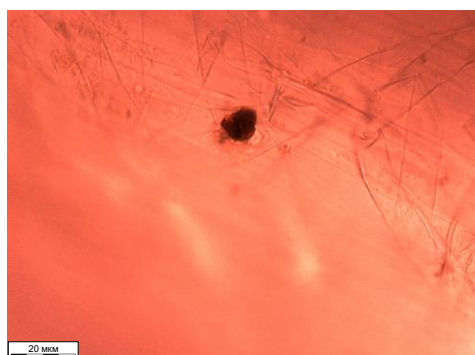


Рис. 1j1.

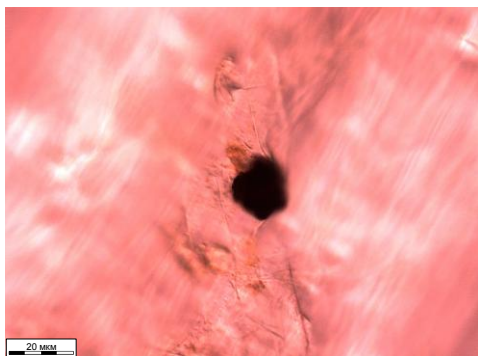


Рис. 1i.

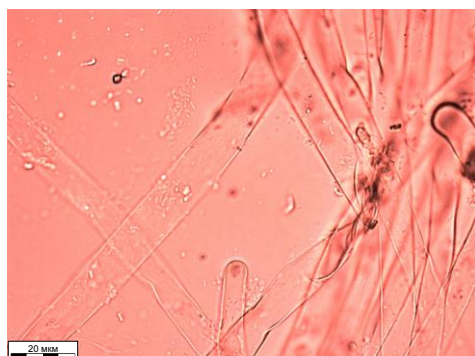


Рис. 1j2.

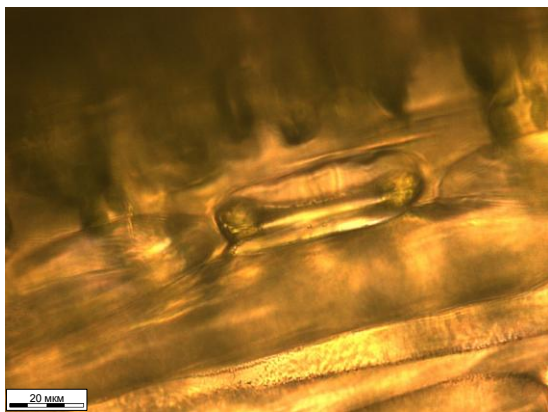


Рис. 2а.

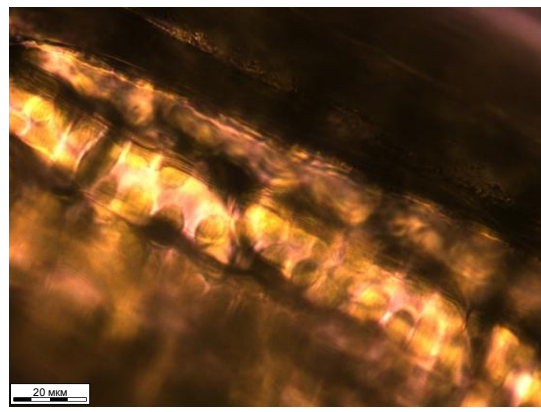


Рис. 2с.

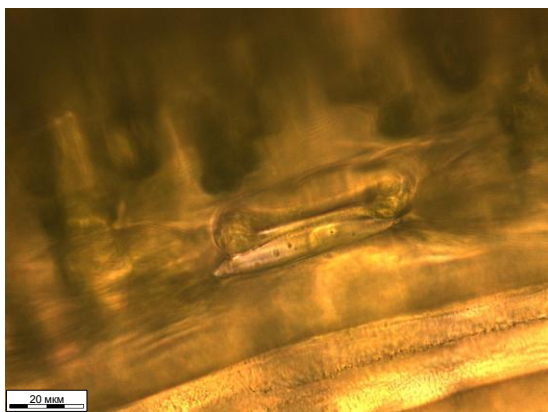


Рис. 2а1.

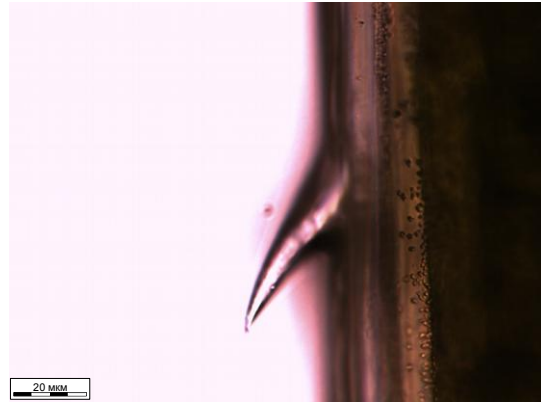


Рис. 2д.

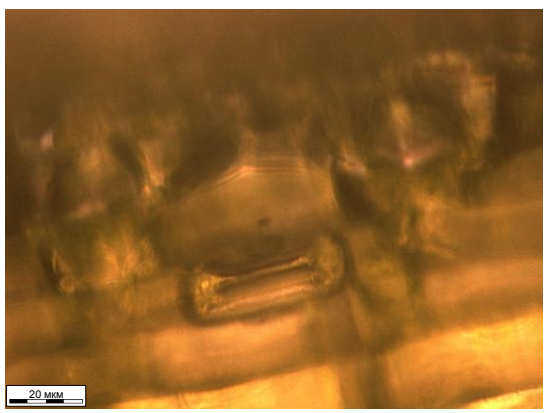


Рис. 2б.



Рис. 2е.

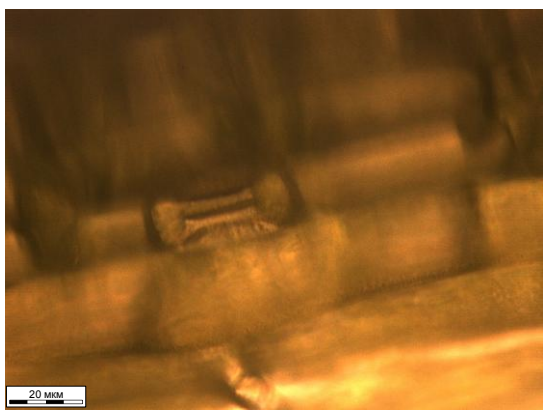


Рис. 2б1.

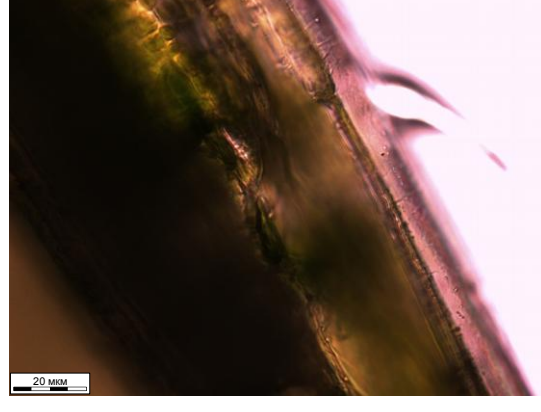


Рис. 2ф.

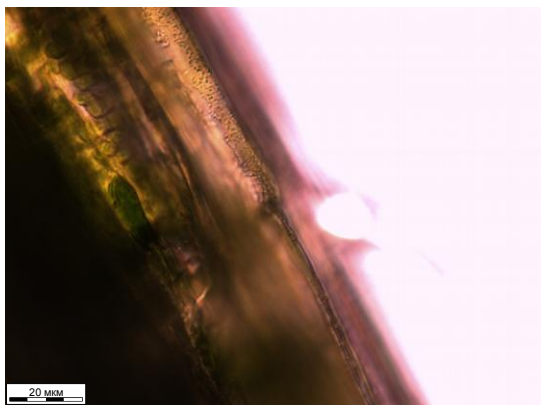


Рис. 2f1.

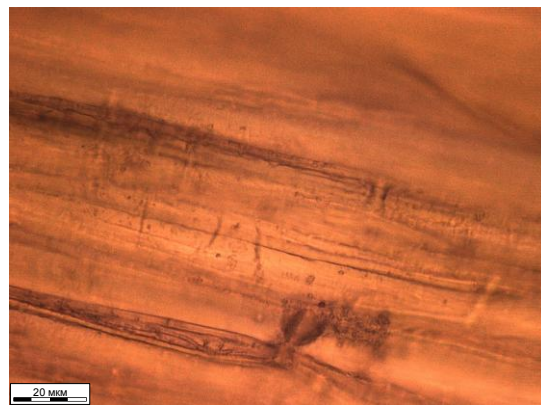


Рис. 2h1.

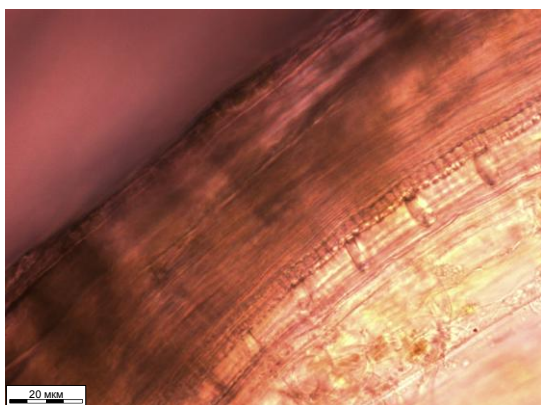


Рис. 2g.

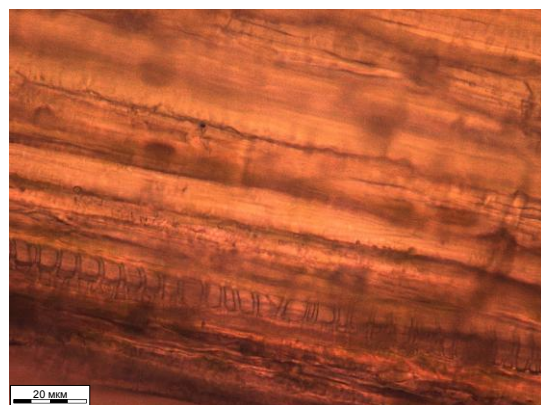


Рис. 2h2.

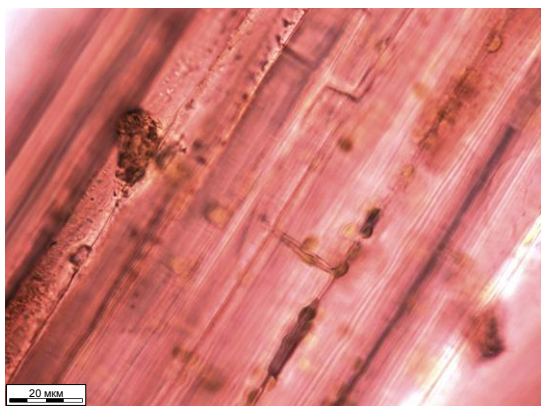


Рис. 2g1.

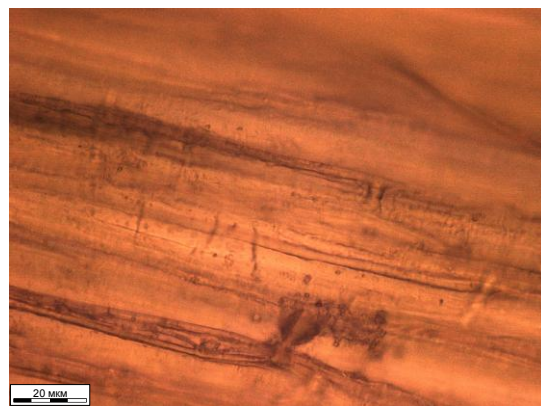


Рис. 2h3.

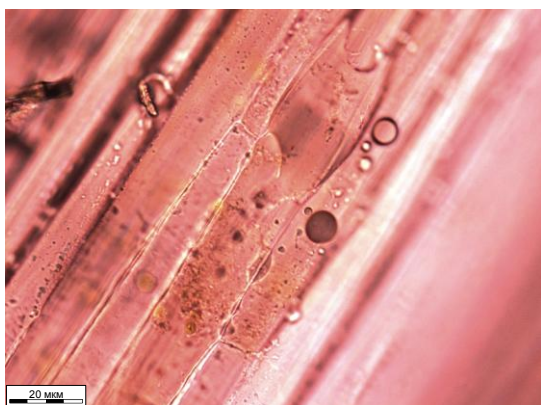


Рис. 2h.

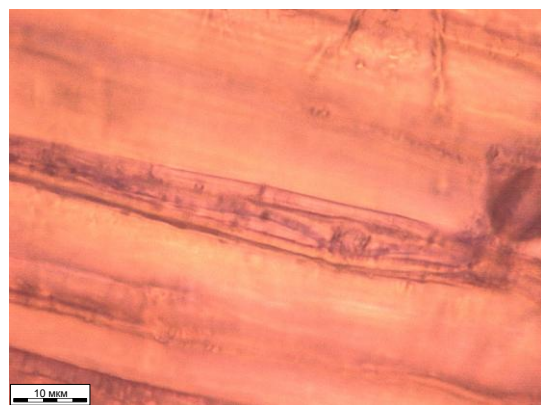


Рис. 2h4.

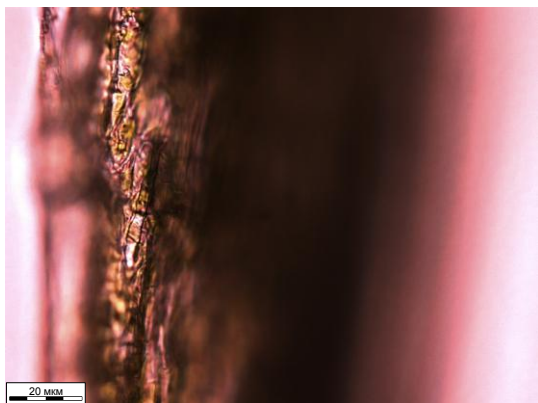


Рис. 2h5.

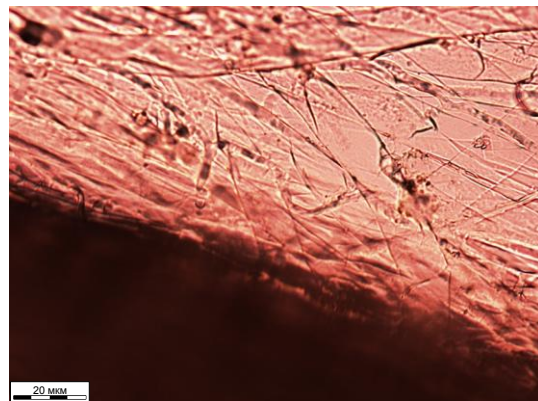


Рис. 2j1.

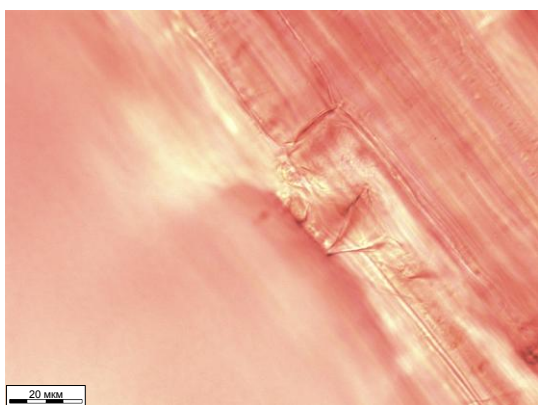


Рис. 2i.

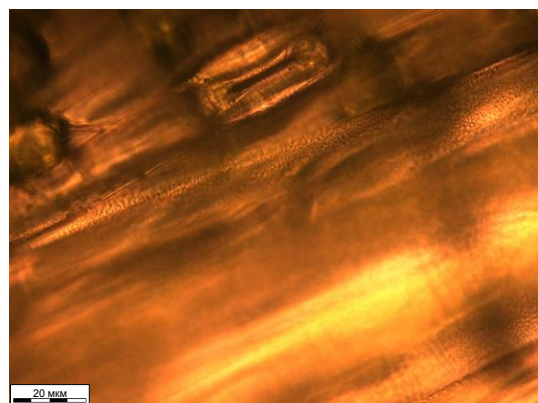


Рис. 3a.

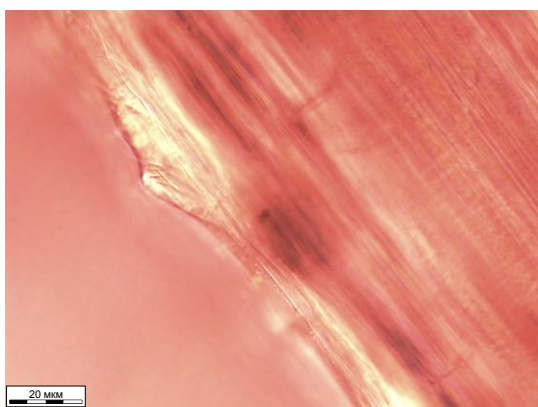


Рис. 2i1.

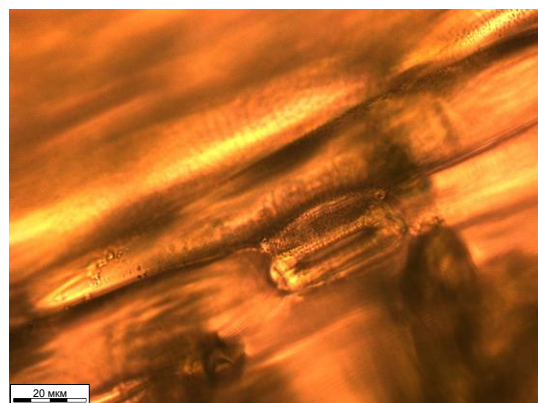


Рис. 3a1.

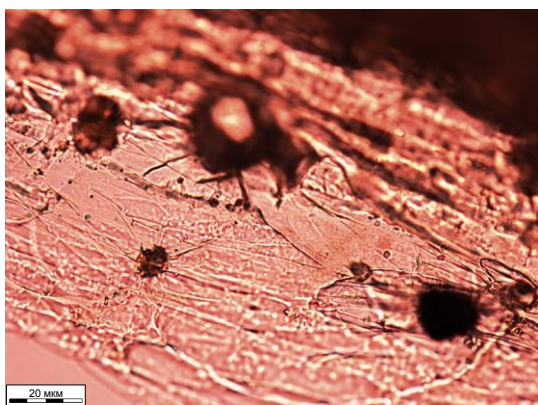


Рис. 2j.

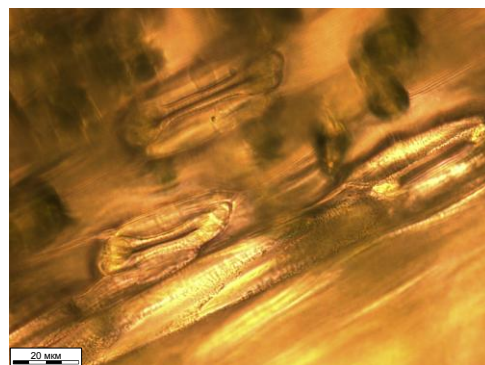


Рис. 3a2.

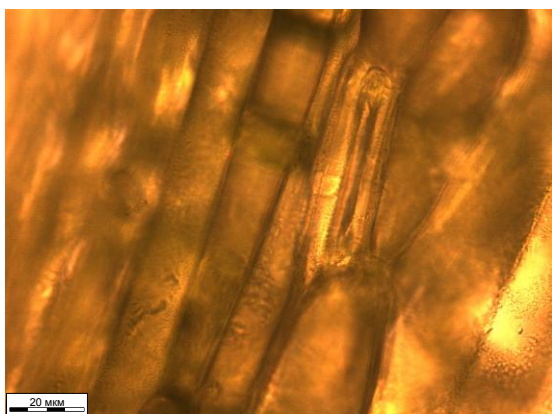


Рис. 3b.

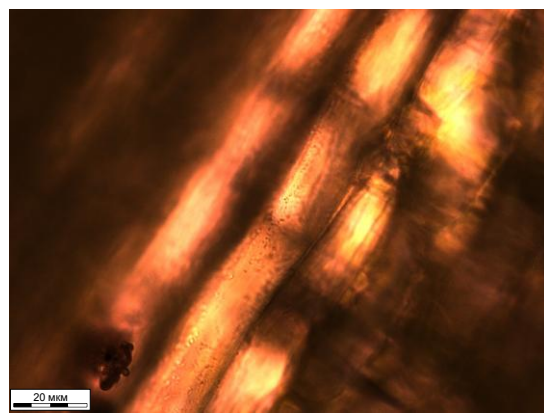


Рис. 3d.

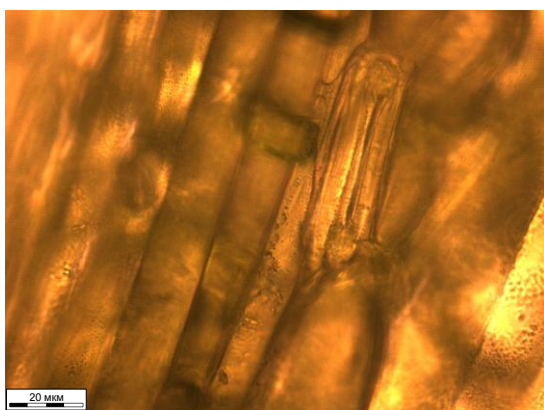


Рис. 3b1.

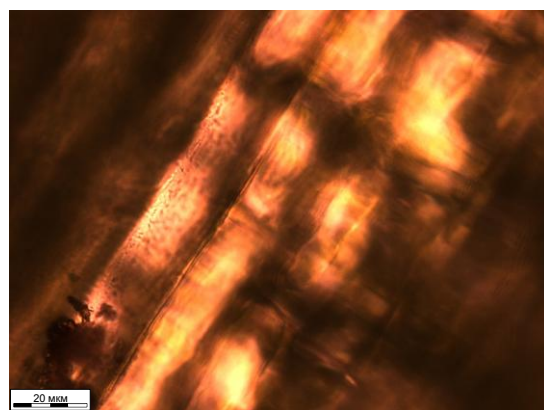


Рис. 3d1.

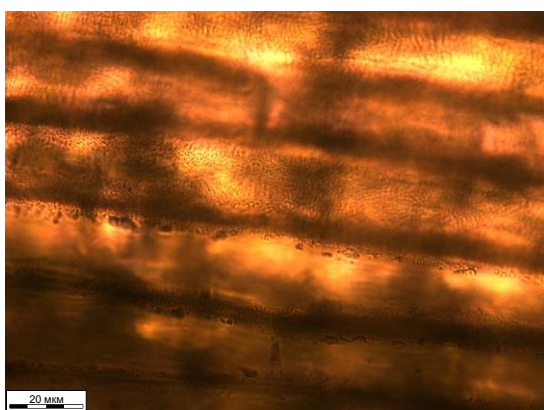


Рис. 3с.

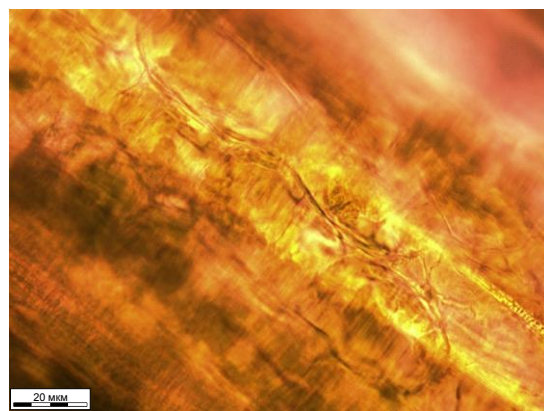


Рис. 3е.

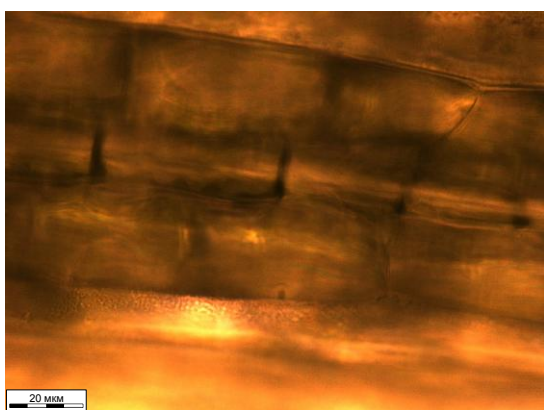


Рис. 3с1.

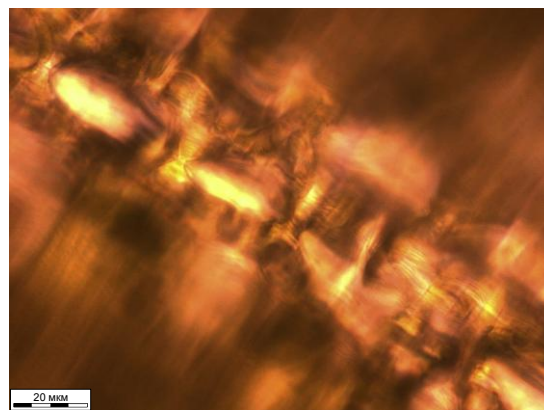


Рис. 3f.

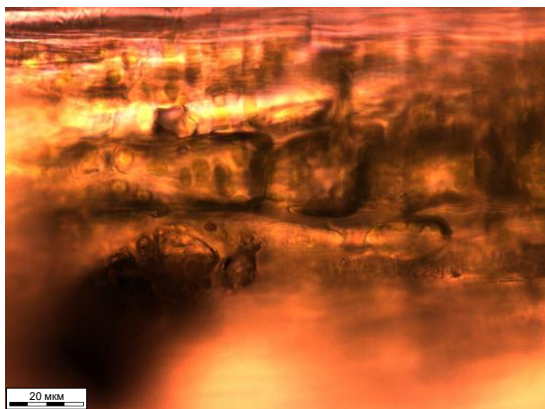


Рис. 3г.

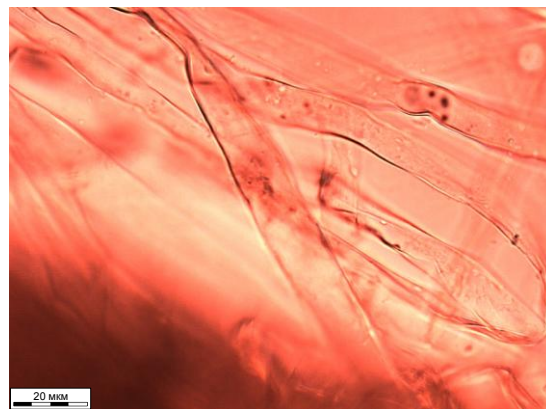


Рис. 3i.

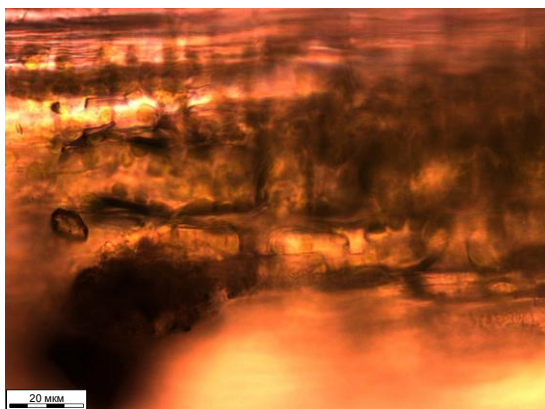


Рис. 3г1.

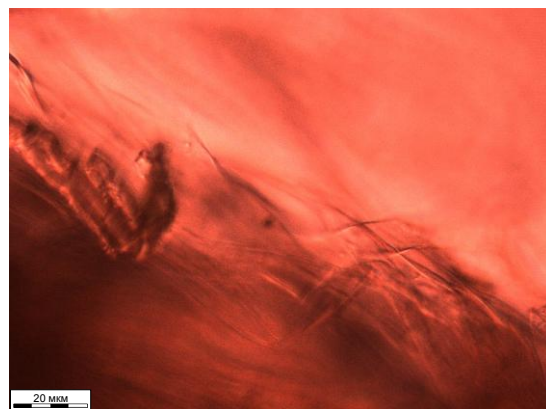


Рис. 3i1.

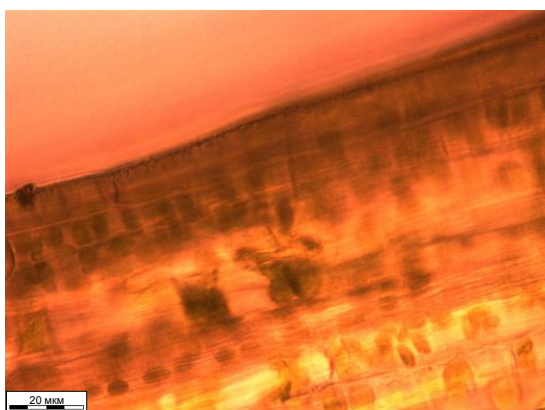


Рис. 3h.

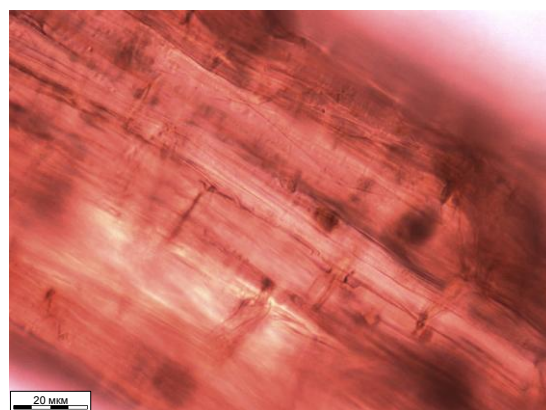


Рис. 3i2.

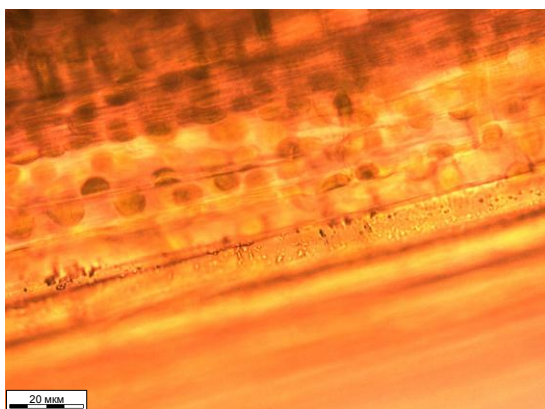


Рис. 3h1.

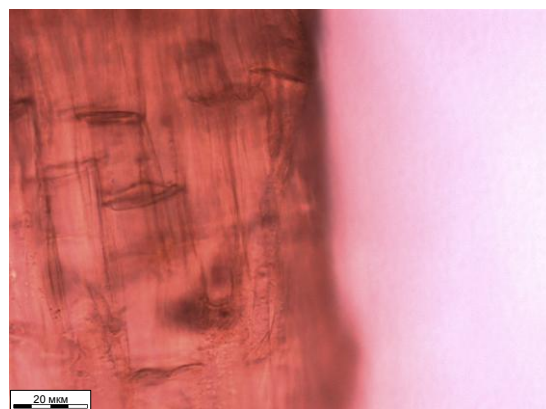


Рис. 3j.

1.3.2.2. Метаболизм в интактном растении. Распределение метаболитов по органам и тканям растений. Внешняя секреция.

На 6-й день с момента погружения корневой системы в раствор ЭТК, растения злаков целиком извлекали, при этом смывы с листьев проводили 3 мл дистиллированной воды. Затем все растения промывали дистиллированной водой, аккуратно протирали фильтровальной бумагой. Скальпелем отделяли корешки от листьев и полученный растительный материал (навески по 0.2 г) помещали в пробирки с ацетонитрилом (2.0 мл). Спустя 12 ч, полученные экстракты использовали в хроматографических исследованиях.

Хроматографические исследования проводили на аналитической колонке с неподвижной фазой C18. Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (8 : 2). Температура колонки 30 °С. Данные хроматографии показали, что ЭТК в злаках практически сразу же подвергается воздействию эстераз, приводя к образованию продукта гидролиза – 6-(трифторметил)комановой кислоты **2**. Соединение **2** обнаружено как в корнях, так и в листьях исследованных злаков в концентрациях, порядка 10^{-4} моль/л. При этом исходный ЭТК не был обнаружен ни в листьях, ни в корнях растений даже в следовых количествах. Анализ смывов с листьев растений показал отрицательные результаты на наличие **2**, что говорит об отсутствии внешней секреции **2** через поверхность листьев. Вероятно, внешняя секреция фторсодержащих метаболитов через листья все-таки происходит, однако, по-видимому, путем испарения более летучих продуктов более глубокого метаболизма (например, ТФУ). Также не обнаружено соединение **2** и в питательном растворе, что исключает сколько-нибудь значительную экссудацию этого соединения через корневую систему. Накопление основной части фторсодержащих метаболитов происходит, скорее всего, за счет идиобластов, которые хорошо видны на рисунках 2h3 и 2h4. Наличие высокой концентрации 6-(трифторметил)комановой кислоты **2** в тканях злаков при отсутствии выраженного негативного влияния (развитие растений в течение 6 дней воздействия ЭТК происходило нормально, скорость роста листьев на 10% превышала таковую для контрольных образцов). Внешне наличие ЭТК в питательном растворе проявлялось большей свернутостью листьев, однако, этот факт, скорее всего, связан со специфическим воздействием ксенобиотика на работу особого аппарата, играющего роль при свертывании и разворачивании листьев, которым обладают ксерофитные злаки.

1.4. Теоретические исследования в области хемосистематики

Хемосистематика - раздел систематики, изучающий разнообразие химического состава организмов, их органов и тканей с целью создания полной системы (классификации) в живой природе. Традиционно хемосистематика использует методы биохимии, молекулярной биологии, генетики, математики (в том числе квантово-химические расчеты). Основой хемосистематики являются знания о белковом, липидном, углеводном, нуклеотидном составе живых клеток, а также о наличии тех или иных вторичных метаболитов (алкалоидов, терпеноидов, флавоноидов и др.). Изучение химического состава организмов позволяет подойти к вопросу классификации с другой стороны, а также расширить набор анализируемых признаков фенотипов, что, в первую очередь, важно для систематики микроорганизмов, низших растений, решения вопросов, связанных со спорной классификацией высших растений и др. Кроме того, хемосистематика позволяет по-другому взглянуть на эволюционные процессы, т.к. образование того или иного вторичного метаболита, аминокислоты, терпеноида отражает реальный процесс экспрессии конкретных генов. Поэтому, возможность или невозможность образования какого-либо соединения при рассмотрении группы растений позволяет соотнести химические процессы, протекающие в растительных клетках с определенными эволюционными событиями. Анализ химического состава ДНК, РНК и белков позволяет оценить сходство генотипов организмов (геносистематика), и зачастую позволяет обойтись без трудоемких процедур сквенирования. Большинство работ по хемосистематике связано главным образом с обнаружением в живых объектах известных молекул. При этом исследуется метаболизм как пробиотиков, так и ксенобиотиков. Значительно меньше затрагиваются вопросы, связанные с хемосистематикой на основе данных о метаболизме ксенобиотиков природного происхождения, и почти совершенно непроработанным остаются вопросы, связанные с хемосистематикой, построенной на основе данных по метаболизму ксенобиотиков синтетического происхождения. Однако именно эта группа субстратов позволяет определить особенности экспрессии генов, увидеть тонкую структуру регуляции экспрессии сложных генных локусов. Дело в том, что растения, как и другие живые организмы, хорошо «знакомы» с большинством известных органических молекул, вступая с ними в химический контакт на протяжении малых или больших отрезков эволюции. Поэтому, вопросы, связанные с метаболизмом большинства ксенобиотиков природного происхождения, оказались решенными на геномном уровне (результат изменчивости). При попадании же в живой организм (растение) «незнакомых» соединений синтетического происхождения экспрессия генов будет

ограничиваться тем закодированным в хромосомах опытом, который накопился в ходе эволюции. Использование этого опыта будет осуществляться за счет поиска в ксенобиотике топологически близких фрагментов, метаболизм или катаболизм которых возможен благодаря экспрессируемым ферментам. Разнообразие таких ферментов для данного вида растения может оказаться достаточно большим, однако, в любом случае, оно будет определяться генетическим материалом. В этой ситуации (обнаружение в молекуле ксенобиотика синтетического происхождения структурных фрагментов, топологически подобных структурным фрагментам в пробиотиках или природных ксенобиотиках) возникает проблема селективности (избирательности) фермента. Выделяемый фермент может оказаться достаточно избирательным и химически преобразовать структурный фрагмент ксенобиотика. Такое химическое преобразование позволяет ввести в молекулу ксенобиотика какую-либо функциональную группу. Наличие такой функциональной группы обычно облегчает дальнейший метаболизм, т.к. именно эта группа будет индуцировать образования новых ферментов и она же станет местом биораспада модифицированного ксенобиотика (или местом конъюгации). Однако, образующийся фермент (ферменты) может оказаться неизбирательным и привести к нежелательному распаду жизненно важных молекул клетки. Такой путь экспрессии химически схож с процессами, которые внешне проявляются у человека и животных в форме аллергии (выделение антител и ферментов на внешние раздражители, которые разрушают собственные же клетки организма). Исходя из вышеизложенного, с точки зрения возникновения пары ксенобиотик–фермент, можно условно разделить все ксенобиотики неприродного происхождения на две группы. К первой группе можно отнести соединения, которые не обнаруживаются в природе, но наибольшие (по количеству атомов) фрагменты молекул которых структурно идентичны (почти идентичны) фрагментам молекул пробиотиков или встречающихся в природе ксенобиотиков. Такие соединения являются аналогами природных соединений и их метаболизм иногда можно предсказать. Если эти вещества являются аналогами таких природных соединений, которые обладают какими-либо биологически активными свойствами (например, принадлежат к какой-либо группе лекарств), то и от самих аналогов в ряде случаев следует ожидать проявления соответствующей биологической активности. Будут или не будут проявлять ожидаемую биологическую активность аналоги природных соединений, зависит от избирательности (селективности) ферментов, которые образуются в качестве отклика на появление в клетке синтетического ксенобиотика. Так как за образование ферментов, а значит и за их селективность, ответственен генетический материал, то и предсказать биологическую

активность более или менее корректно можно на основании генетики организма. Именно поэтому, предсказание биологической активности нового соединения, как правило, является сложной задачей, требующей комплексного подхода. Перечисленные выше особенности, связанные с селективностью ферментов, приводят, например, к тому, что замена даже одного атома (например, водорода) в сложной молекуле лекарства на другой атом или группу (например, метильную), может привести к полному отсутствию ожидаемого вида биологической активности в модифицированной таким образом молекуле или появлению совсем другого вида биологической активности. Подобного рода эффекты, вызванные заменой одной функциональной группы на другую, создают некоторую неопределенность при теоретическом конструировании молекул с предполагаемыми биологически активными свойствами. Однако эта неопределенность будет намного меньше, если используемые фармакофорные группы и фрагменты рассматривать не в изолированном виде, а в паре «фармакофор – остальная часть молекулы», с использованием экспериментальных данных по метаболизму родственных соединений. Поиск алгоритма «генетический материал → биологическая активность» является прямой задачей. Обладая же набором ксенобиотиков синтетического происхождения определенного строения и различными видами организмов (растений) определенных родов (семейств) в качестве исследуемых живых субстратов, можно рассчитывать на решение обратной задачи: «биологическая активность → генетический материал». Если принять во внимание то, что образование метаболитов определенной природы это ни что иное, как отклик генетического материала на ксенобиотик, то особенности строения генетического материала как такового можно опустить. Таким образом, возникает косвенная задача: «набор метаболитов → биологическая активность». Решение этой задачи может оказаться не менее информативным, чем решение прямой задачи, а трудоемкость и временные затраты, учитывая тот факт, что современный возможный уровень приборной базы позволяет за несколько минут качественно и количественно определить десятки-сотни метаболитов в сложной смеси (например, при наличии хромато-масс-ЯМР-спектрометра) могут быть многократно снижены. Таким образом, используя в экспериментах по метаболизму различные синтетические ксенобиотики, можно получать данные о более тонкой химической структуре растений, выделять в отдельные группы виды по способности образования определенного набора метаболитов из ксенобиотиков синтетического происхождения, выбирать нужные растения для посева с целью ремедиации нарушенных почв под действием загрязнителей определенной природы, получения метаболитов с заданной структурой и т.д. В случае,

например, трифторметилированных ксенобиотиков, в зависимости от строения основной части молекулы, следует ожидать замедление окислительного метаболизма (в случае протекания такового) в β -положении по отношению к трифторметильной группе или ускорение восстановления двойной связи (если CF_3 группа связана с таковой) за счет проявления эффекта гиперконъюгации между двойной связью и атомами фтора трифторметильной группы (снижение энергии НВМО). Полученные в настоящей работе экспериментальные данные хорошо показывают насколько высоко влияние вида на направление метаболизма. Обнаруживается специфическое влияние функциональных групп на направление метаболизма. Так, ЭТК легко претерпевал глубокий метаболизм под действием тканей клубня картофеля, тогда как 2-(трифторметил)-4*H*-пиран-4-он, отличающийся от ЭТК лишь отсутствием группы COOEt , не подвергался метаболизму. Таким образом, в данном случае, можно предположить, что группа COOEt является своеобразной мишенью, с которой начинается распад пиранового кольца. Капуста белокочанная и морковь, растения из разных семейств (крестоцветные, сельдерейные), проявили как сходство (гидролитический метаболизм), так и различие (проявление окислительно-восстановительного метаболизма в случае капусты белокочанной) при метаболизме трифторметилированных производных комановой кислоты. Таким образом, метаболизм трифторметилированных ксенобиотиков может стать хорошим инструментом для определения биохимических свойств растений.

1.5. Анализ спектральных данных

Анализ спектральных данных приводится выше, при описании строения соединений. Детально спектральные данные (ЯМР ^1H , ^{19}F , ^{13}C , ИК) приведены в разделе Экспериментальная часть.

1.6. Экспериментальная часть (выборочно)

ИК-спектры получены на приборах «Perkin-Elmer Spectrum BX-II» и «Nicolet 6700» в таблетках с KBr и тонком слое, а также с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Спектры ЯМР ^1H и ^{19}F записаны на спектрометре «Bruker DRX-400» в CDCl_3 и DMCO-d_6 , рабочие частоты 400 МГц (^1H), 376 МГц (^{19}F) и 100 МГц (^{13}C), внутренние стандарты – Me_4Si (^1H), ГФБ (^{19}F). Элементный анализ выполнен на автоматическом анализаторе «PE 2400».

Этил 2,6-дигидрокси-4-оксо-7,7,7-трифторгепта-2,5-диеноат (31a). В колбу объемом 100 мл, снабженную обратным холодильником, поместили 30 мл абсолютного ТГФ и 6.0 г (20 моль) динатриевого производного **29a**. К перемешиваемой и охлаждаемой на ледяной бане смеси постепенно добавили 2.4 мл 85%-ной HCO_2H . Полученную смесь перемешивали 15–20 мин, поддерживая температуру при $\sim 0^\circ\text{C}$. Затем растворители отгоняли под вакуумом без нагрева, остаток смешали с 50 мл CCl_4 и полученный таким образом раствор пропустили через слой силикагеля (2 см³) для удаления примесей. Растворитель из фильтрата испарили в чашке Петри, а остаток перекристаллизовали из петролейного эфира с добавлением толуола. Выход 1.27 г (25 %), бесцветные кристаллы, т.пл. 89–90 °C. Найдено (%): C, 42.70; H, 3.40. $\text{C}_9\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_5$. Вычислено (%): C, 42.53; H, 3.57. ИК-спектр, KBr, ν/cm^{-1} : 1725, 1652, 1635. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): **31a** (82%) 1.39 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 4.38 (к, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$); 5.99 (с, 1 H, H(5)); 6.34 (с, 1 H, H(3)); 12.0–14.0 (уш.с, 2 H, OH); **32a** (18%) 1.37 (т, 3 H, Me, $J = 7.2$); 2.90 (д, 1 H, CHH , $J_{\text{AB}} = 17.0$); 2.95 (д, 1 H, CHH , $J_{\text{AB}} = 17.0$); 4.35 (с, 1 H, OH); 4.36 (к, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$); 6.40 (с, 1 H, =CH). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д.): **31a** (82%) 86.95 (с, CF_3); **32a** (18%) 75.97 (с, CF_3). Спектр ЯМР ^1H (DMCO-d_6 , δ , м.д.): **32a** (96%) 1.28 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 2.73 (д, 1 H, CHH , $J_{\text{AB}} = 16.6$); 3.26 (д, 1 H, CHH , $J_{\text{AB}} = 16.6$); 4.31 (к, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$); 6.24 (д, 1 H,

=CH, $J = 1.0$); 9.20 (уш.с, 1 Н, ОН). Спектр ЯМР ^{19}F (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): **32a** (96%) 78.72 (с, CF_3); **32a** (4%) 92.54 (с, CF_3).

Этил 2,6-дигидрокси-4-оксо-7,7-дифторгепта-2,5-диеноат (31b). Получен аналогично соединению **31a**, выход 47%, бесцветные кристаллы, т.пл. 87–88 °С. Найдено (%): С, 45.53; Н, 4.20. $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_5$. Вычислено (%): С, 45.77; Н, 4.27. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): **31b** (90%) 1.36 (т, 3 Н, Ме, $J = 7.1$); 4.37 (к, 2 Н, OCH_2 , $J = 7.1$); 5.99 (с, 1 Н, Н(5)); 6.05 (т, 1 Н, CHF_2 , $J = 54.0$); 6.34 (с, 1 Н, Н(3)); 12.0–14.0 (уш.с, 2 Н, ОН). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): **32b** (100%) 1.27 (т, 3 Н, Ме, $J = 7.1$); 2.55 (д, 1 Н, CHH , $J_{\text{AB}} = 16.8$); 3.07 (д, 1 Н, CHH , $J_{\text{AB}} = 16.8$); 3.4 (уш.с, 1 Н, ОН); 4.29 (к, 2 Н, OCH_2 , $J = 7.1$); 6.16 (т, 1 Н, CHF_2 , $^2J_{\text{H,F}} = 54.3$); 6.48 (с, 1 Н, =CH). Спектр ЯМР ^{19}F (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): **31b** (90%) 35.18 (д, CF_2H , $^2J_{\text{H,F}} = 53.9$); **32b** (10%) 25.56 (д.д, CFH , $^2J_{\text{F,F}} = 290.2$, $^2J_{\text{H,F}} = 55.3$); 29.10 (д.д, CFH , $^2J_{\text{F,F}} = 290.2$, $^2J_{\text{H,F}} = 55.3$). Спектр ЯМР ^{19}F (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): **32b** (100%) 27.26 (д.д, CFH , $^2J_{\text{F,F}} = 285.2$, $^2J_{\text{H,F}} = 54.6$); 31.17 (д.д, CFH , $^2J_{\text{F,F}} = 285.2$, $^2J_{\text{H,F}} = 54.6$).

Этил 7-амино-5-(трифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-2-карбоксилат (34a). В этанол (4 мл) внесли **1** (0.25 г, 1.05 ммоль), и гидрохлорид аминогуанидина (0.17 г, 1.5 ммоль). Полученную смесь кипятили 6 ч, затем разбавили водой, выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из 50%-ного EtOH . Выход 0.12 г (17%), бесцветные кристаллы, т.пл. 142 °С. Найдено (%): С, 43.39; Н, 3.05; N, 20.26. $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$. Вычислено (%): С, 43.80; Н, 3.31; N, 20.43. ИК-спектр, НПВО, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3466, 3109, 1716, 1665, 1615. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.35 (т, 3 Н, Ме, $J = 7.1$); 4.40 (кв, 2 Н, CH_2 , $J = 7.1$); 7.18 (с, 1 Н, пираз.); 7.51 (с, 1 Н, пирим.); 8.33 (с, 2 Н, NH_2). Спектр ЯМР ^{19}F (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 94.81 (с, CF_3). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.1 (CH_3), 61.2 (CH_2), 99.8 (к, C_4 , $^3J_{\text{C,F}} = 4.1$), 102.7 (C_3), 121.7 (к, CF_3 , $^1J_{\text{C,F}} = 273.0$), 137.2 (к, C_5 , $^2J_{\text{C,F}} = 34.4$), 141.2 (C_{3a}), 146.5 (C_2), 147.9 (C_7), 161.4 ($\text{C}=\text{O}$). **Рентгеноструктурное исследование**

соединения 34a выполняли на автоматическом монокристалльном дифрактометре «Xcalibur 3» с CCD детектором (MoK α излучение, $\lambda = 0.71073$ Å, графитовый монохроматор, $T = 295$ K). Кристаллографические данные: $a = 5.0208(7)$, $b = 10.9027(19)$, $c = 11.214(2)$ Å, $\alpha = 76.087(15)^\circ$, $\beta = 77.895(14)^\circ$, $\gamma = 87.575(13)^\circ$, $V = 582.578$ Å³, пространственная группа $P\bar{1}$, триклинная сингония, $Z = 2$, $Z' = 0$, C₁₀H₉F₃N₄O₂, $d_{calc} = 1.563$ г/см⁻³. Структуру расшифровывали прямым методом по программе SHELXS-97 [94]. Уточнение параметров структуры проводили методом наименьших квадратов в анизотропно-изотропном (для атомов H) приближении по комплексу программ SHELXL-97 [94]. Детали рентгеноструктурного исследования приведены в Кембриджском центре структурных данных (CCDC 819529).

Этил 7-амино-5-(дифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-2-карбоксилат (34b) и этил 7-амино-2-(дифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-5-карбоксилат (35b).

Синтез из 30. Смесь региоизомерных пиразолопиримидинов **34b** и **35b** была получена аналогично соединению **34a** (перекристаллизация из EtOH). Выход 17%, бесцветные кристаллы, т.пл. 186–188 °C. Найдено (%): C, 46.62; H, 3.85; N, 21.80. C₁₀H₁₀F₂N₄O₂. Вычислено (%): C, 46.88; H, 3.93; N, 21.87. ИК-спектр, НПВО, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3467, 1715, 1659, 1613, 1563, 1534. Спектр ЯМР ¹H (ДМСO-d₆, δ , м.д., J/Гц): **34b** (60%) 1.32 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 4.32 (к, 2 H, OCH₂, $J = 7.1$); 6.79 (т, 1 H, CHF₂, $J = 55$); 7.03 (с, 1 H, =CH); 7.27 (с, 1 H, =CH); 8.07 (с, 2 H, NH₂); **35b** (40%) 1.34 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 4.39 (к, 2 H, OCH₂, $J = 7.1$); 7.12 (с, 1 H, =CH); 7.28 (т, 1 H, CHF₂, $^2J_{\text{H,F}} = 54$); 7.74 (с, 1 H, =CH); 8.12 (с, 2 H, NH₂).

Синтез из 31b. В охлажденный до 0 °C раствор триоксоэфира **31b** (0.10 г, 0.42 ммоль) в 2 мл этанола при перемешивании постепенно внесли раствор карбоната амингуанидина (0.06 г, 0.44 ммоль) в 2 мл этанола. Смесь перемешивали на холоду 10 мин, затем довели до кипения и избыток спирта испарили. В остаток добавили 3 мл воды и полученный раствор охладили до 0 °C. Выпавший осадок отфильтровали, промыли минимальным

количеством воды, высушили и перекристаллизовали из толуола. Выход смеси **34b** : **35b** (2 : 3) 0.025 г (22%), бесцветный порошок, т.пл. 195–200 °С.

7-Амино-5-(трифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-2-карбоновая кислота (34c).

В 3 мл воды внесли пирон **33** (0.25 г, 1.2 ммоль), 3 капли конц. HCl, и гидрохлорид аминогуанидина (0.27 г, 2.4 ммоль). Полученную суспензию кипятили 1 ч, выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из 50%-ного этанола. Выход 0.20 г (65%), бесцветный порошок, возг. 275 °С. Найдено (%): С, 37.57; Н, 2.41; N, 21.62. $C_8H_5F_3N_4O_2 \cdot 0.5H_2O$. Вычислено (%): С, 37.66; Н, 2.37; N, 21.96. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.14 (с, 1 H, пираз.); 7.50 (с, 1 H, пирим.); 8.29 (с, 2 H, NH_2); 13.52 (уш.с, 1 H, CO_2H).

7-Амино-5-(дифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-2-карбоновая кислота (34d).

Получена аналогично соединению **34c** (нагревание в течение 1.5 ч, перекристаллизация из 50%-ного EtOH), выход 50%, бесцветные кристаллы, возг. 306–308 °С. Найдено (%): С, 42.05; Н, 2.41; N, 24.52. $C_8H_6F_2N_4O_2$. Вычислено (%): С, 42.11; Н, 2.65; N, 24.56. ИК-спектр, НПВО, ν/cm^{-1} : 3450, 1699, 1670, 1613, 1566, 1536, 1501. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 6.79 (т, 1 H, CF_2H , $^2J_{H,F} = 55.0$ Гц); 7.08 (с, 1 H, пираз.); 7.26 (с, 1 H, пирим.); 8.07 (с, 2 H, NH_2); 13.34–13.56 (уш.с, 1 H, OH). Спектр ЯМР ^{19}F (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 45.16 (д, CF_2H , $^2J_{H,F} = 54.9$ Гц).

Этил 7-амино-2-(трифторметил)пиразоло[1,5-с]пиримидин-5-карбоксилат (35a).

В охлажденный до 0 °С раствор **31a** (0.10 г, 0.39 ммоль) в 2 мл EtOH постепенно, при перемешивании, внесли взвесь бикарбоната аминогуанидина (0.054 г, 0.40 ммоль) в 2 мл этанола. Смесь перемешивали на холоду 15 мин, после чего довели до кипения, избыток растворителя испарили, остаток смешали с 3 мл воды и полученный раствор охладили до 0 °С. Выпавший осадок отфильтровали, промыли минимальным количеством этанола и высушили. Выход 0.020 г (15%), бесцветные кристаллы, т.пл. 202–203 °С. Найдено (%): С,

43.69; H, 3.46; N, 20.19. $C_{10}H_9F_3N_4O_2$. Вычислено (%): C, 43.80; H, 3.31; N, 20.43. ИК-спектр, KBr, ν/cm^{-1} : 3477, 3084, 1723, 1691, 1587. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 1.32 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 4.32 (к, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$); 7.24 (с, 1 H, =CH, пираз.); 7.76 (с, 1 H, =CH, пирим.); 8.2 (уш.с, 2 H, NH_2). Спектр ЯМР ^{19}F ($CDCl_3$, δ , м.д.): 99.32 (с, CF_3). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 14.3 (CH_3), 62.1 (CH_2), 98.95 (к, C3, $^3J_{C,F} = 2.2$), 105.9 (C4), 120.8 (к, CF_3 , $^1J_{C,F} = 270.0$), 138.7 (C3a), 141.8 (C5), 146.6 (C2, $^2J_{C,F} = 38.5$), 147.0 (C7), 164.3 (C=O).

Этил 7-тиоксо-2-трифторметил-6,7-дигидропиразоло[1,5-с]пиримидин-5-карбоксилат (36). В этанол (4 мл) внесли пирон **1** (0.25 г, 1.05 ммоль), тиосемикарбазид (0.10 г, 1.1 ммоль) и конц. HCl (0.2 мл). Реакционную смесь кипятили 4 ч, после чего разбавили водой (10 мл), выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из 50%-ного EtOH. Выход 0.04 г (13%), светло-желтый порошок, т.пл. 170–171 °C. Найдено (%): C, 38.61; H, 3.13; N, 13.32. $C_{10}H_8F_3N_3O_2S \cdot H_2O$. Вычислено (%): C, 38.84; H, 3.26; N, 13.59. ИК-спектр, KBr, ν/cm^{-1} : 1743, 1721, 1631, 1514. Спектр ЯМР 1H ($DMCO-d_6$, δ , м.д., J/Гц): 1.36 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 4.38 (кв, 2 H, CH_2 , $J = 7.1$); 7.41 (с, 1 H, пираз.); 7.85 (с, 1 H, пирим.); 13.5 (уш.с, 1 H, NH). Спектр ЯМР ^{19}F ($DMCO-d_6$, δ , м.д.): 101.18 (с, CF_3). Спектр ЯМР ^{13}C ($DMCO-d_6$, δ , м.д., J/Гц): 13.9 (CH_3), 62.6 (CH_2), 102.6 (неразр.к, C3), 105.9 (C4), 120.8 (к, CF_3 , $^1J_{C,F} = 270.0$), 129.6 (C5), 139.1 (C3a), 146.5 (к, C2, $^3J_{C,F} = 37.8$), 159.8 (C7), 167.8 (C=O).

Этил 3-(5-гидрокси-1-тиокарбамоил-5-трифторметил-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил)-2-оксопентаноат (37). Смесь триоксоэфира **31a** (0.10 г, 0.39 ммоль) и тиосемикарбазида (0.036 г, 0.39 ммоль) перемешивали в 3.0 мл 30%-ного этанола в течение 30 мин, после чего раствор довели до кипения и избыток этанола испарили. К остатку добавили 1 мл воды, выпавший осадок отфильтровали, промыли минимальным количеством воды, высушили на фильтре, затем промыли горячим толуолом. Выход 0.05 г

(39%), бесцветные кристаллы, возг. 240–250 °С. Найдено (%): С, 36.52; Н, 3.64; N, 12.85. $C_{10}H_{12}F_3N_3O_4S$. Вычислено: С, 36.70; Н, 3.70; N, 12.84. ИК-спектр, НПВО, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3177, 1709, 1686, 1531. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6 + CCl_4 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.32 (т, 3 H, Me, $J = 7.1$); 2.78 (д, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}$, $J_{\text{AB}} = 17.6$); 3.26 (д, 1 H, $\text{CH}\underline{\text{H}}$, $J_{\text{AB}} = 17.6$); 4.32 (к, 2 H, OCH_2 , $J = 7.1$); 3.40 (д, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}$, $J_{\text{AB}} = 19.6$); 3.55 (д, 1 H, $\text{CH}\underline{\text{H}}$, $J_{\text{AB}} = 19.6$); 9.54 (с, 1 H, $\text{N}\underline{\text{H}}\text{H}$); 10.32 (с, 1 H, $\text{NH}\underline{\text{H}}$). Спектр ЯМР ^{19}F (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 79.11 (с, CF_3). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 + CCl_4 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 14.0 (CH_3); 37.4 (CH_2); 46.8 (CH_2); 61.0 (CH_2); 79.2 (к, $\underline{\text{C}}-\text{CF}_3$, $^2J_{\text{C,F}} = 31.6$); 122.7 (к, CF_3 , $^1J_{\text{C,F}} = 286.9$); 148.6 ($\text{C}=\text{N}$); 160.7 ($\text{C}=\text{O}$); 160.8 ($\text{C}=\text{O}$); 173.9 ($\text{C}=\text{S}$).

1.6. Отчет по обобщению и оценке результатов исследований

В ходе выполненных исследований показано, что производные 2-трифторметил-4*H*-пиран-4-она могут претерпевать метаболизм в тканях растений либо по пути восстановления двойных связей (C=C связи при CF₃ группе и C=O связи), либо по пути гидролиза бокового заместителя при атоме C-2 пиранового кольца, при этом различные виды растений по-разному участвуют в метаболизме трифторметилированных производных пирана. На примере 6-(трифторметил)команоата (ЭТК) показано, что производные этилкоманоата под действием тканей моркови претерпевают гидролиз, тогда как под действием тканей капусты белокочанной происходит биовосстановление до производных 4-гидрокси-5,6-дигидро-4*H*-пиран-2-карбоксилата, которые являются ядрами биологически активных кислот и гликозидов. Обнаружено, что ЭТК индуцирует образование в тканях картофеля 3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазина. На основе 6-(трифторметил)комановой кислоты и ее производных синтезирован целый трифторметилированных производных непиранового ряда: трифторметилированных 3-(пиразолил)индолов и пиразоло[1,5-с]пиримидинов, которые представляют большой интерес как с точки зрения использования их в качестве трифторметилированных ксенобиотиков индольного и пиразолопиримидинового рядов, так и с точки зрения использования в медицинской химии в целях создания новых потенциальных лекарств, обладающих антидиабетической активностью и свойствами ингибиторов PDK-киназы. Выполнены исследования метаболизма ЭТК в интактных растениях злаков и показано, что при попадании в корневую систему, этот ксенобиотик сразу же подвергается гидролизу под действием растительных эстераз до 6-(трифторметил)комановой кислоты, которая распределяется как по корневой системе, так и по тканям листьев, не оказывая какого-либо выраженного негативного влияния на развитие растений. Полученные результаты могут использоваться в синтезе трифторметилированных аналогов природных биологически активных веществ, содержащих дигидропирановое кольцо путем биовосстановления трифторметилированных пиранов под действием тканей, в получении новых лекарственных средств, в ремедиации нарушенных почв, загрязненных экотоксикантами известной природы, для исследований в области хемосистематики.

1.7. Публикации результатов НИР

В настоящем разделе прилагаются копии статей (2 шт.) и экспертные заключения (2 шт.).

2. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работ по III этапу получены следующие результаты:

-показано, что производные 2-трифторметил-4*H*-пиран-4-она могут претерпевать метаболизм в тканях растений либо по пути восстановления двойных связей (C=C связи при CF₃ группе и C=O связи), либо по пути гидролиза бокового заместителя при атоме C-2 пиренового кольца;

-обнаружено, что различные виды растений по-разному участвуют в метаболизме трифторметилированных производных пирана. При использовании в качестве ксенобиотика 6-(трифторметил)команоата (ЭТК) показано, что этот трифторметилированный пирон под действием тканей моркови быстро претерпевает гидролиз до 6-(трифторметил)комановой кислоты, тогда как под действием тканей капусты белокочанной он претерпевает селективное восстановление до этил *цис*-4-гидрокси-6-(трифторметил)-5,6-дигидро-4*H*-пиран-2-карбоксилата, который является трифторметилированным аналогом циклического ядра таких биологически активных соединений, как псевдаминная кислота, *N*-ацетилнейраминная кислота, Pse гликозид и Neu5Ac гликозид;

-найден, что ЭТК индуцирует образование в тканях картофеля 3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазина, что, по-видимому, связано с участием в процессах дезактивации трифторметилированных метаболитов молекул белковой природы, которые разрушаются с экструдией аминокислот (3,6-диизобутил-2,5-дикетопиперазин является продуктом циклодимеризации лейцина – аминокислоты, широко представленной в протеинах картофеля);

-на основе 6-(трифторметил)комановой кислоты и ее производных синтезирован целый трифторметилированных производных непиранового ряда: трифторметилированных 3-(пиразолил)индолов и пиразоло[1,5-*c*]пиримидинов, которые представляют большой интерес как с точки зрения использования их в качестве трифторметилированных ксенобиотиков индольного и пиразолопиримидинового рядов, так и с точки зрения использования в медицинской химии в целях создания новых потенциальных лекарств, обладающих антидиабетической активностью и свойствами ингибиторов PDK–киназы;

-исследован метаболизм ЭТК в интактных растениях злаков и показано, что при попадании в корневую систему, он сразу же подвергается гидролизу под действием растительных эстераз до 6-(трифторметил)комановой кислоты, которая распределяется

как по корневой системе, так и по тканям листьев, не оказывая какого-либо выраженного негативного влияния на развитие растений;

-полученные результаты имеют следующее практическое значение: а) в синтезе трифторметилированных аналогов природных биологически активных веществ, содержащих дигидропирановое кольцо путем биовосстановления трифторметилированных пиранов под действием тканей растений (напр., тканей капусты белокочанной); б) в получении новых лекарственных средств; в) в ремедиации нарушенных почв, загрязненных экотоксикантами известной природы; г) для исследований в области хемосистематики.

3. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Kutchan, T. M. Alkaloid Biosynthesis - The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell* **1995**, 7, 1059–1070.
- [2] Stöckigt, J.; Zenk, M. N. Strictosidine (isovincoside): The key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 912–914.
- [3] Hashimoto, T.; Hayashi, A.; Amano, Y.; Kohno, J.; Iwanari, H.; Usuda, S.; Yamada, Y.. Hyoscyamine 6p-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J. Biol. Chem.* **1991** 266, 4648–4653.
- [4] Nakajima, K.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9591–9595.
- [5]. Matsuda, J.; Okabe, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. Molecular cloning of hyoscyamine 6P-hydroxylase, a 2-oxoglutaratedependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 9460–9464.
- [6] Dittrich, H.; Kutchan, T. M. Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 9969–9973.
- [7] Kraus, P. F. X.; Kutchan, T. M. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbamin synthase, a C-O phenolcoupling cytochrome P-450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2071–2075.
- [8] a) Hughes, G. I.; Lahey, F. N.; Price, J. R.; Webb, L. J. Alkaloids of the Australian Rutaceae. *Nature* **1948**, 162, 223–224; b) Linden, A.; Akineri, G. Noyan, S.; Gözler, T.; Hesse, M. Amaryllidaceae Alkaloids: (+)-Tazettine, (+)-3-O-Demethylcristine and (+)-3-Epimacronine at 173 K
- [9] Yang, Z.-H.; Zeng, R.; Yang, G.; Wang, Yu.; Li, L.-Z.; Lv, Z.-S.; Yao, M.; Lai, B. Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 35, 1047–1051.
- [10] Speicher, A.; Roeser, H.; Heisel, R. Stereoselective oxidoreductase type bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes. *J. Mol. Catal. B.* **2003**, 22 71–77.
- [11] Сосновских, В. Я.; Иргашев, Р. А. Усачев. Б. И. Синтез и некоторые свойства 2-полифторалкилхроман-4-олов и 2-полифторалкилхроман-4-онов. *Изв. АН, Сер. хим.* **2009**, N 12, 2386–2394.

- [12] Lee, Y. J.; Kubota, Ishiwata, A. A.; Ito, Y. Synthesis of pseudaminic acid, a unique nonulopyranoside derived from pathogenic bacteria through 6-deoxy-AltdiNAc. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 418–421.
- [13] Usachev, B. I.; Obydenov, D. L.; Kodess, M. I.; Sosnovskikh, V. Ya. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4446–4448.
- [14] Usachev, B. I.; Obydenov, D. L.; Sosnovskikh, V. Ya. Regioselective synthesis of trifluoromethylated 3-(pyrazolyl)indoles on the basis of 6-(trifluoromethyl)comanic acid. *Tetrahedron* **2011**.
- [15] Wang, Z.; Ge, F.; Wan, W.; Jiang, H.; Hao, J. *J. Fluor. Chem.* **2007**, 128, 1143–1152.
- [16] Ge, F.; Wang, Z.; Wan, W.; Hao, J. *Synlett* **2007**, 447–450.
- [17] Muzalevskiy, V. M.; Shastin, A. V.; Balenkova, E. S.; Haufe, G.; Nenajdenko, V. G. *Russ. Chem. Bull.* **2008**, 57, 2217–2219.
- [18] Miyashita, K.; Tsuchiya, K.; Kondoh, K.; Miyabe, H.; Imanishi, T. *Heterocycles* **1996**, 42, 513–516.
- [19] Henegar, K. E.; Hunt, D. A. *Heterocycles* **1996**, 43, 1471–1476.
- [20] Girard, Y.; Atkinson, J. G.; Bélanger, P. C.; Fuentes, J. J.; Rokach, J.; Rooney, C. S. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3220–3234.
- [21] Chen, Q.-Y.; Li, Z.-T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 645–648.
- [22] Kino, T; Nagase, Y; Ohtsuka, Y; Yamamoto, K; Uraguchi, D; Tokuhisa, K; Yamakawa, T. *J. Fluor. Chem.* **2010**, 131, 98–105.
- [23] Yoshida, M; Yoshida, T; Kobayashi, M; Kamigata, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 909–914.
- [24] Wiehn, M. S.; Vinogradova, V. E.; Togni A. *J. Fluor. Chem.* **2010**, 131, 951–957.
- [25] Myiashita, K; Kondoh, K; Tsuchiya, K.; Miyabe, H.; Imanishi, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1996**, 1261–1268.
- [26] Fürstner, A.; Hupperts, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4468–4475.
- [27] Chae, J.; Konno, T.; Ishihara, T.; Yamanaka, H. *Chem. Lett.* **2004**, 33, 314–315.
- [28] Konno, T.; Chae, J.; Ishihara, T.; Yamanaka, H. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8258–8265.
- [29] Fayn, J.; Nezis, A.; Cambon, A. *J. Fluor. Chem.* **1987**, 36, 479–482.
- [30] Chen, Y.; Wang, Y.; Sun, Z.; Ma, D. *Org. Lett.* **2008**, 10, 625–628.
- [31] Gange, D. M. EP Patent 0697172; *Chem. Abstr.* 1996, 124, 223751.
- [32] Muzalevskiy, V. M.; Nenajdenko, V. G.; Shastin, A. V.; Balenkova, E. S.; Haufe, G. *Tetrahedron* **2009**, 65, 7553–7561.
- [33] Jiang, H.; Wang, Y.; Wan, W.; Hao, J. *Tetrahedron* **2010**, 66, 2746–2751.

- [34] Wan, W.; Hou, J.; Jiang, H.; Wang, Y.; Zhu, S.; Deng, H.; Hao, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4212–4219.
- [35] Acton, J. J.; Debenham, S. D.; Liu, K.; Meinke, P. T.; Wood, H. B.; Black, R. M. WO Patent 2004/20408 A1, 2004; *Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 253442.
- [36] Usachev, B. I.; Obydenov, D. L.; Sosnovskikh, V. Ya. *Russ. Chem. Bull.* **2010**, *59*, 300–301.
- [37] Gorbunova, V. P.; Turchin, K. F.; Suvorov, N. N. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **1970**, *6*, 1406–1409.
- [38] Okitsu, T.; Sato, K.; Wada, A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3506–3509.
- [39] Jakše, R.; Svete, J.; Stanovnik, B.; Golobič, A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 4601–4608.
- [40] Gorbunova, V. P.; Suvorov, N. N. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **1973**, *9*, 1374–1377.
- [41] Stupnikova, T. V.; Nuzhnaya, T. V.; Klyuev, N. A.; Chervinskii A. Yu. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1982**, *18*, 164–169.
- [42] Servi, S.; Akguen, Z. R. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 3399 – 3406.
- [43] Sawy, E. R. E.; Mandour, A. H.; Metwaly, A. M. E. *Egypt. J. Chem.* **2007**, *50*, 667–681.
- [44] Abdallah, T. A. *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, *44*, 961 – 965.
- [45] Gmeiner, P.; Huebner, H.; Safieh, K. A. A.; Fafous, I. I.; El-Abadelah, M. M.; Sabri, S. S.; Voelter, W. *Heterocycles* **2003**, *60*, 1339–1350.
- [46] Safieh, K. A. A.; El-Abadelah, M. M.; Sabri, S. S.; Zarga, M. H. A.; Voelter, W.; Moessmer, C. M. *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 623–628.
- [47] Abu-Safieh, K. A.; El-Abadelah, M. M.; Sabri, S. S.; Voelter, W.; Moessmer, C. M.; Stroebele, M. Z. *Naturforsch., B* **2002**, *57*, 1327–1332.
- [48] Maettner, M.; Neunhoeffter, H. *Synthesis* **2003**, 413–425.
- [49] Tawaraishi, T.; Imoto, H.; Cho, N. US Patent 2008/0194617 A1, 2008; *Chem. Abstr.* **2008**, *149*, 268044.
- [50] Cocconcelli, G.; Diodato, E.; Caricasole, A.; Gaviraghi, G.; Genesio, E.; Ghiron, C.; Magnoni, L.; Pecchioli, E.; Plazzi, P. V.; Terstappen, G. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2043–2052.
- [51] Diana, P.; Carbone, A.; Barraja, P.; Martorana, A.; Gia, O.; DallaVia, L.; Cirrincione, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6134–6137.
- [52] Brăna, M. F.; Gradillas, A.; Ovalles, A. G.; López, B.; Acero, N.; Llinares, F.; Mingarro, D. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 9–16.
- [53] Abdel-Gawad, H.; Mohamed, H. A.; Dawood, K. M.; Badria, F. A.-R. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 1529–1531.

- [54] Singh, S. K.; Saibaba, V.; Rao, K. S.; Reddy, P. G.; Daga, P. R.; Rajjak, S. A.; Misra, P.; Rao, Y. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 977–990.
- [55] Dandia, A.; Sehgal, V.; Singh, P. *Indian J. Chem., B* **1993**, *32*, 1288–1291.
- [56] Tikhe, J. G.; Webber, S. E.; Hostomsky, Z.; Maegley, K. A.; Ekkers, A.; Li, J.; Yu, X.-H., Almassy, R. J.; Kumpf, R. A.; Boritzki, T. J.; Zhang, C.; Calabrese, C. R.; Curtin, N. J.; Kyle, S.; Tomas, H. D.; Wang, L.-Z.; Calvert, A. H.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Newell, D. R. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5467–5481.
- [57] Reich, S. H.; Wallace, M. B. US Patent, 2002/6952 A1, 2002.
- [58] Ghiron, C.; Nencini, A.; Micco, I.; Zanaletti, R.; Maccari, L.; Bothmann, H.; Haydar, S.; Varrone, M.; Pratelli, C. Harrison, B. WO Patent 2008/87529 A1, 2008. *Chem. Abstr.* 2008, 149, 200921.
- [59] Bleisch, T. J.; Clarke, C. A.; Dodge, J. A.; Jones, S. A.; Lopez, J. E.; Lugar, C. W.; Muehl, B. S.; Richardson, T. I.; Yee, Y. K.; Yu, K.-L. WO Patent 2007/87488 A2, 2007. *Chem. Abstr.* **2007**, *147*, 235009.
- [60] Hwang, P. S.; Takasugi, J.; Ren, H.; Wilde, R. G.; Turpoff, A.; Arefolov, A.; Karp, G. M.; Chen, G.; Campbell, J. A. WO Patent 2006/19831 A1, 2006. *Chem. Abstr.* **2006** *144*, 254002.
- [61] Steinman, M.; Tahbaz, P. US Patent 4225711 A1, 1980. *Chem. Abstr.* **1980**, *93*, 239223.
- [62] Allen, M. P.; Chen, Y. L.; Liras, S.; Rosati, R. L. WO Patent 2004/33434 A1, 2004. *Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 357664.
- [63] Haydar, S. N.; Bothmann, H.; Ghiron, C.; Maccari, L.; Micco, I.; Nencini, A.; Zanaletti, R. WO Patent 2010/9290 A1, 2010. *Chem. Abstr.* **2010**, *152*, 192109.
- [64] Dekker, W. H.; Selling, H. A.; Overeem, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 785–791.
- [65] Chen, C.-S.; Chiu, H.-C.; Wang, D. US Patent 20090111799 A1, 2009; *Chem. Abstr.* **2009**, *150*, 494860.
- [66] Chen, C.-S. WO Patent WO2005/44130 A1, 2005; *Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 90911.
- [67] Diab, J.; Laurent, A.; Dréan, I. L. *J. Fluor. Chem.* **1997**, *84*, 145–147.
- [68] Sosnovskikh, V. Ya.; Sizov, A. Yu.; Usachev, B. I. *Russ. Chem. Bull.* **2002**, *51*, 1270–1279.
- [69] Singh, S. K.; Saibaba, V.; Rao, K. S.; Reddy, P.G.; Daga, P. R.; Rajjak, S. A.; Misra, P.; Rao, Y. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 977–990.
- [70] Reddy, M. V. R.; Billa, V. K.; Pallela, V. R.; Mallireddigari, M. R.; Boominathan, R.; Gabriel, J. L.; Reddy, E. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3907–3916.
- [71] Leon, S. L.; Choi, J. H.; Kim, B. T.; Leong, I. H. *J. Fluor. Chem.* **2007**, *128*, 1191–1197.
- [72] Usachev, B. I.; Shafeev, M. A.; Sosnovskikh, V. Ya. *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 523–528.

- [73] Usachev, B. I.; Usachev, S. A.; Röschenthaler, G. V.; Sosnovskikh, V. Ya. *Russ. Chem. Bull.* **2010**, 59, 845–847.
- [74] P. G. Baraldi, B. Cacciari, G. Spalluto, M. J. P. Villatoro, C. Zocchi, S. Dionisotti, E. Ongini, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1164.
- [75] N. M. Abunada, H. M. Hassaneen, N. G. Kandile, O. A. Miqdad, *Molecules*, 2008, **13**, 1501.
- [76] US Pat. 7745446 B2; *Chem. Abstrs.*, 2006, **144**, 350709.
- [77] Ger. Pat. 2058501; *Chem. Abstrs.*, 1972, **77**, 88530.
- [78] В. А. Дорохов, М. А. Презент, В. С. Богданов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1994, 2211.
- [79] В. А. Дорохов, И. В. Кравцов, П. А. Беляков, С. В. Баранин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2007, 992.
- [80] Ю. А. Жданов, Э. А. Звездина, С. М. Стаценко, А. Н. Максимова, *Химия гетероцикл. соедин.*, 1987, 182.
- [81] P. Molina, A. Tàrraga, C. Serrano, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 4901.
- [82] M. G. Marei, *J. Islamic Acad. Sci.*, 1993, **6**, 8.
- [83] M. G. Marei, D. M. Aly, M. M. Mishrikey, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1992, **65**, 3419.
- [84] M. G. Marei, M. El-Ghanam, *J. Chem. Res., Miniprint*, 1993, 2175.
- [85] Б. И. Усачев, Д. Л. Обыденнов, М. И. Кодесс, Г.-В. Рошенталер, В. Я. Сосновских, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2009, 1213.
- [86] Б. И. Усачев, Д. Л. Обыденнов, В. Я. Сосновских, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2010, 291.
- [87] Б. И. Усачев, И. А. Бизенков, В. Я. Сосновских, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2007, 537.
- [88] Б. И. Усачев, С. А. Усачев, Г.-В. Рошенталер, В. Я. Сосновских, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2010, 827.
- [89] M. A. Walker, T. Johnson, Z. Ma, J. Banville, R. Remillard, O. Kim, Y. Zhang, A. Staab, H. Wong, A. Torri, H. Samanta, Z. Lin, C. Deminie, B. Terry, M. Krystal, N. Meanwell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 2920.
- [90] US Pat. 006548546 B2. *Chem. Abstrs.*, 2001, **136**, 53535.
- [91] M. Stiles, J. P. Selegue, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 4067.
- [92] E. Kranz, J. Kurz, W. Donner, *Chem. Ber.*, 1972, **105**, 388.
- [93] Ger. Pat. DE 2 131 790; *Chem. Abstr.*, 1973, **78**, 97694.
- [94] G. M. Sheldrick. The SHELX-97 manual. – Göttingen (Germany): Univ. of Göttingen, 1997.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Спектр ЯМР ^1H этил *цис*-4-гидрокси-6-(трифторметил)-5,6-дигидро-4*H*-пиран-2-карбоксилата

ПРИЛОЖЕНИЕ 2**Копия диплома доктора наук**

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Копия благодарственного письма